

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**Departamento de Inmunología, Oftalmología y
Otorrinolaringología**



TESIS DOCTORAL

**Estudio serológico del herpesvirus humano tipo 6 en pacientes
con esclerosis múltiple**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Ortega Madueño

Directores

**Rafael Arroyo González
Roberto Álvarez Lafuente**

Madrid 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Inmunología e Inmunopatología



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO SEROLÓGICO DEL HERPESVIRUS
HUMANO TIPO 6 EN PACIENTES CON ESCLEROSIS
MÚLTIPLE**

Memoria para optar al **GRADO DE DOCTOR** presentada por:

Isabel Ortega Madueño

Directores:

Dr. Rafael Arroyo González

Dr. Roberto Álvarez Lafuente

Madrid, 2017

El Dr. Rafael Arroyo González, Jefe de Servicio de Neurología del Hospital Universitario Quirónsalud Madrid y el Dr. Roberto Álvarez Lafuente del Grupo de Investigación de Esclerosis Múltiple del Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC)

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Estudio serológico del Herpesvirus Humano Tipo 6 en pacientes con Esclerosis Múltiple”** ha sido realizado bajo su dirección en el grupo de investigación de Esclerosis Múltiple del Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos de Madrid por Dña. Isabel Ortega Madueño, licenciada en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid y que dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para obtener el GRADO DE DOCTOR por la misma universidad.

FDO: Dr. Rafael Arroyo González

FDO: Dr. Roberto Álvarez Lafuente

Madrid a 25 de Septiembre de 2017

Dedicada a mi padre

AGRADECIMIENTOS



En primer lugar quería agradecer a mis directores, el Dr. Rafael Arroyo González y el Dr. Roberto Álvarez Lafuente el haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en el laboratorio del grupo de Investigación de Esclerosis Múltiple del Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos. En especial quería agradecerle a Roberto su disponibilidad en cualquier momento para resolver cualquier duda y para ayudarme en lo que necesitara y sobre todo, la paciencia que ha tenido conmigo para terminar esta tesis.

Muchas gracias a las compañeras del laboratorio de la Unidad de Esclerosis Múltiple, a Marta, por compartir sus amplios conocimientos en virus, a María, por estar siempre dispuesta a ayudar, a Ana, por saber dónde está todo y tener siempre una sonrisa y a Ángel, por su energía a todas horas.

La etapa en la que realicé la tesis en la Unidad de Esclerosis Múltiple coincidió primero con mi etapa como residente y luego con mi etapa como investigadora en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Clínico San Carlos, por eso también quería agradecerles a mis compañeros del Servicio de Análisis el haberme acompañado a lo largo de todos estos años.

En primer lugar quería agradecer tanto al Dr. Arroyo como a la Dra. Cuadrado, las facilidades que siempre me han dado para compaginar mi trabajo en el Servicio de Análisis con la realización de esta tesis.

Dar las gracias también a todos los resis, con los que he vivido guardias, congresos, viajes, risas, cañas... y tantos momentos inolvidables. A los de antes..., con los que compartí los cuatro años de residencia, especialmente a Carmen y a

Fiz, por todos los ratos que pasamos juntos, y a los de ahora... especialmente a Cris B., Ana A., Cris M. y Kike, por ser siempre tan positivos.

Dar las gracias también a Irene, por todos los momentos que vivimos dentro y fuera del hospital a lo largo de estos años y por su optimismo siempre y a David, por los desayunos y todo lo que aprendí, por las risas y las horas y horas hablando... y por “obligarme” a empezar a escribir (por fin) esta tesis.

Muchas gracias a todas las compañeras del Servicio de Análisis, a Inés, Olga, Mari Cruz, Lola R., Lola O., M. Ángeles, Isabel... por todo lo que me he aprendido de ellas durante estos años.

Y especialmente dar las gracias a mis compañeros del laboratorio de Proteómica. A Fran por su comprensión, su tranquilidad y por haber sido tan buen compañero. Y por supuesto, dar las gracias a Carmela, por ser una persona tan especial, por estar siempre a mi lado, por su sinceridad, por sus palabras y por sus silencios y porque sin su ayuda no podría hacer ni la mitad del trabajo. Gracias.

Muchas gracias también a M. José Torrejón, por sus consejos y su apoyo, por sacar un rato siempre para escucharme..., por supuesto por ser mi tutora, porque sin ella la residencia no habría sido lo mismo y sobre todo, porque junto con Roberto son las personas que más paciencia han tenido para que consiguiera acabar esta tesis... Gracias a los dos por no parar de insistir, por animarme a escribir y por no dejar que me rindiera.

Y por último dar las gracias a mi familia, muy especialmente a mi padre, que fue un ejemplo de lucha, y porque lo hizo todo muy, muy fácil, siempre con una sonrisa.

Esta tesis es para él.

También gracias a mi abuela Isa, por su buen humor siempre. Gracias a mi madre porque siempre está a mi lado y a mis hermanos por su apoyo.

Muchas gracias a todos por haberme acompañado durante estos años y por enseñarme tanto... de ciencia y sobre todo, de la vida.

Gracias.

INDICE



ABREVIATURAS	17
RESUMEN/ SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	47
1. <i>Patogenia</i>	50
2. <i>Formas clínicas</i>	54
3. <i>Diagnóstico</i>	56
4. <i>Tratamiento</i>	59
4.1 <i>Tratamientos de primera línea</i>	60
4.2 <i>Tratamientos de segunda y tercera línea</i>	64
5. <i>Epidemiología</i>	67
6. <i>Etiología</i>	70
6.1 <i>Etiología genética</i>	72
6.2 <i>Etiología ambiental</i>	75
HIPÓTESIS	83
OBJETIVOS	87
MATERIALES Y MÉTODOS	91
1. <i>Población de estudio</i>	93
2. <i>Muestras</i>	94
3. <i>Variables clínicas</i>	94
4. <i>Comité de ética</i>	95
5. <i>ELISA anti-HHV-6A/B IgG e IgM</i>	95
6. <i>Detección de anticuerpos neutralizantes (NAbs) contra INF-β</i>	98
7. <i>Análisis genético</i>	101
7.1 <i>Aislamiento, cuantificación y pureza del ADN</i>	101
7.2 <i>Genotipado HLA</i>	101
7.3 <i>Genotipado del alelo HLA-DRB1*1501</i>	102
7.4 <i>Genotipado de SNPs-GWAS</i>	104
7.5 <i>SNPs genotipados</i>	106
8. <i>Análisis estadístico</i>	110

RESULTADOS	113
1. Serología anti-HHV-6A/B en pacientes con EM y controles sanos	115
1.1 Serología IgG anti-HHV-6A/B	115
1.2 Serología IgM anti-HHV-6A/B	115
2. Serología anti-HHV-6A/B en pacientes con EM en función del tratamiento	116
2.1 Serología IgG anti-HHV-6A/B	116
2.2 Serología IgM anti-HHV-6A/B	117
3. Serología anti-HHV-6A/B y respuesta clínica en función del tratamiento	119
3.1 Serología IgG anti-HHV-6A/B y respuesta al tratamiento	120
3.2 Serología IgM anti-HHV-6A/B y respuesta al tratamiento	129
4. Serología anti-HHV-6A/B y progresión de la enfermedad	130
5. Serología anti-HHV-6A/B y brotes	133
6. Análisis de la asociación de las variantes alélicas HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 con la serología anti-HHV-6A/B	138
7. Análisis de la asociación de los SNPs-GWAS con la serología anti-HHV-6A/B	145
DISCUSIÓN	151
1. Serología anti-HHV-6A/B y evolución de la enfermedad	153
1.1 Serología anti-HHV-6A/B y tratamiento con interferones	155
1.2 Serología anti-HHV-6A/B y tratamiento con acetato de glatirámico	158
1.3 Serología anti-HHV-6A/B y tratamiento con natalizumab	159
1.4 Comparación de los tres tratamientos	160
2. Serología anti-HHV-6A/B y genética	163
2.1 Serología anti-HHV-6A/B y variantes alélicas HLA	163
2.2 Serología anti-HHV-6A/B y SNPs-GWAS	166
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXO: PUBLICACIONES	207

ABREVIATURAS



ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
ADN	Acido desoxirribonucleico
AG	Acetato de Glatirámero
APCs	Células presentadoras de antígeno <i>Antigen presenting cells</i>
ARN	Ácido ribonucleico
BHE	Barrera hematoencefálica
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIS	Síndrome clínico aislado <i>Clinical Isolated Syndrome</i>
CMV	Citomegalovirus
CPE	Ensayo de efecto citopático <i>Cythopathogenic effect</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle´s medium</i>
EBV	Virus de Epstein-Barr <i>Epstein-Barr virus</i>
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EM	Esclerosis Múltiple
EM-PP	Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva
EM-PR	Esclerosis Múltiple Primaria Recurrente
EM-RR	Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente
EM-SP	Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
EMA	Agencia Europea del Medicamento <i>European Medicines Agency</i>
FSB	Suero fetal bovino <i>Fetal Serum Bovine</i>
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos <i>Food and Drug Administration</i>

FISH	Hibridación por inmunofluorescencia <i>Hybridation in situ fluorescence</i>
GAS	Sitio de activación de interferón
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HERVs	Retrovirus humanos endógenos <i>Retrovirus human endogenous</i>
HHV-6	Herpesvirus humano tipo 6 <i>Human Herpesvirus 6</i>
HLA	Antígeno Leucocitario Humano <i>Human Leucocyte Antigen</i>
IFR	Factor de respuesta a interferones <i>Interferon response factor</i>
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquinas
INF	Interferón
ISRE	Elemento de respuesta a interferón <i>Interferon Stimulated Reponse</i>
LBs	Linfocitos B
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
LTs	Linfocitos T
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight</i>
MBP	Proteína básica de mielina <i>Myelin basic protein</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MRI	Imágenes de resonancia magnética <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MSRV	Retrovirus asociados a Esclerosis Múltiple <i>Multiple Sclerosis associated Retrovirus</i>

NAbs	Anticuerpos neutralizantes
NGF	Factor de crecimiento nervioso <i>Nerve growth factor</i>
NTZ	Natalizumab
OR	Odds ratio
P25	Percentil 25
P50	Percentil 50
P75	Percentil 75
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa <i>Polymerase chain reaction</i>
PCR-SSOP	<i>Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid</i>
PU	Unidades Panbio
PVE	Potenciales visuales evocados
RM	Resonancia Magnética
rt-PCR	PCR a tiempo real <i>Real Time- Polymerase chain reaction</i>
SBE	Extensión de base única <i>Single base extensión</i>
SI	Sistema inmune
SNC	Sistema Nervioso Central
SNPs	Polimorfismo de nucleótido único <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Thr	Treonina
TMB	Tetrametilbencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral <i>Tumor necrosis factor</i>
TRU	<i>Ten-fold Reduction Units</i>
TTO	Tratamiento

VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares <i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VLA-4	<i>Very late antigen</i>

RESUMEN/ SUMMARY



Introducción

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante y neurodegenerativa que afecta selectivamente al Sistema Nervioso Central (SNC). Fundamentalmente se desarrolla en adultos jóvenes (25-30 años) y se caracteriza por la aparición de lesiones focales en la sustancia blanca (placas), en las que se puede observar desmielinización y destrucción axonal en grado variable con infiltración de gran número de células inflamatorias. En la formación y progresión de la lesión inflamatoria, participan tanto los linfocitos T, actuando sobre el parénquima cerebral tras atravesar la barrera hematoencefálica, como los linfocitos B, que contribuyen al proceso de desmielinización mediante la secreción de anticuerpos.

La EM cursa con alteraciones cognitivas y síntomas motores y sensitivos. La gravedad de los síntomas y la evolución de la enfermedad dependen en gran medida de las poblaciones neuronales afectadas, siendo su aspecto clínico más llamativo, la heterogeneidad en cuanto a su manifestación clínica y progresión. Esto conlleva que el diagnóstico diferencial respecto a otras enfermedades neurológicas deba establecerse mediante estudios paraclínicos complementarios a la exploración neurológica (resonancia magnética, análisis de bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo y potenciales visuales evocados). Clásicamente, los pacientes se agrupan según cuatro formas de EM (EM Remitente-Recurrente, EM Secundaria-Progresiva, EM Primaria-Progresiva y EM Primaria-Recurrente), descritas en función del número de episodios de disfunción neurológica (brotes), el tiempo que transcurre entre ellos y las secuelas funcionales que dejan en el paciente.

El manejo terapéutico de los pacientes con EM se realiza mediante terapias inmunomoduladoras, por un lado tratando los brotes agudos (corticoides, ACTH) y por otro, administrando inmunoterapias de forma crónica para frenar la inflamación que se

va produciendo a lo largo del tiempo. Generalmente, se inicia el tratamiento con medicamentos poco agresivos (interferones, acetato de glatirámico...), hasta que se observa una progresión de la enfermedad y/o un aumento de los brotes, momento en el que se empiezan a administrar fármacos que presentan una mayor potencia terapéutica (natalizumab, fingolimod...), pero que también llevan asociados efectos secundarios más complejos.

En cuanto al factor desencadenante de la EM, todavía se desconoce la etiología de esta enfermedad. Actualmente, la hipótesis patogénica más aceptada sugiere que la EM se desencadena en sujetos genéticamente predispuestos sobre los que incide un factor ambiental, que actuaría en las primeras etapas de la vida (antes de la adolescencia) y que a lo largo del tiempo, pondría en marcha un proceso inmune anormal en el SNC produciendo inflamación de la mielina y degeneración axonal-neural que acabaría desembocando en la aparición de las lesiones características de la enfermedad.

A nivel genético, los estudios realizados hasta la fecha, sugieren que los genes que fundamentalmente están asociados al riesgo de padecer la enfermedad, se encuentran en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), siendo el alelo HLA-DR2 del gen HLA-DRB1, el que primero se asoció con la EM. Fuera de esta región, en los estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se han encontrado otros genes de susceptibilidad, pero se ha visto que su contribución al riesgo total es relativamente baja

En cuanto a la etiología ambiental, el factor que mayoritariamente se ha propuesto como responsable de la enfermedad es una infección viral, aunque hasta la fecha no se ha conseguido identificar a un virus concreto como el desencadenante de la respuesta autoinmune asociada a la EM. Los tres candidatos sobre los que se han acumulado más evidencias son los retrovirus endógenos humanos y dos virus de la

familia *Herpesviridae* (el virus del Epstein-Barr y el Herpesvirus humano 6). El hecho de que estos virus se hayan asociado repetidamente con la EM, en parte es debido a que tras una infección primaria en la infancia o la adolescencia, quedan latentes y sufren reactivaciones periódicas a lo largo del tiempo que se pueden relacionar con el curso clásico en brotes de la EM.

En concreto, el HHV-6 se trata de un virus ubicuo, que presenta neurotropismo y que tras una infección primaria queda latente en las células mononucleares circulantes de sangre periférica pudiendo sufrir reactivaciones periódicas que pueden llegar a derivar en complicaciones neurológicas graves. Sin embargo, a pesar de que existen multitud de estudios que relacionan a este virus con la EM, aún no se ha conseguido establecer un papel causal del HHV-6A/B en la enfermedad, debido en parte a su alta prevalencia en población sana.

Hipótesis

Numerosos estudios han documentado la capacidad neurotrópica del HHV-6A/B y además se han encontrado niveles más altos de este virus en los pacientes con EM que en sujetos sanos en el SNC, en PBMCs, en LCR y en suero, indicando que podría tener un papel importante en la EM.

La serología del HHV6A/B constituye un reflejo de la respuesta inmune frente al virus, por lo que la implicación del HHV-6A/B en la EM podría relacionarse con los niveles de anticuerpos frente a él. Además, como los distintos tratamientos para la EM actúan sobre el sistema inmune, podría existir una correlación entre los niveles de los títulos de anticuerpos frente al HHV-6A/B, la respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad.

Objetivos:

1. Estudiar la variación de los títulos de anticuerpos del virus HHV-6A/B en relación a la progresión de la EM durante dos años de seguimiento en pacientes diagnosticados de esta enfermedad sometidos a distintos tipos de tratamientos: interferón- β (INF- β), acetato de glatirámico (AG) y natalizumab (NTZ).
2. Estudiar la variación de los títulos de anticuerpos del virus HHV-6A/B en relación a la tasa anualizada de brotes durante dos años de seguimiento en pacientes diagnosticados de EM sometidos a distintos tipos de tratamientos: INF- β , AG y NTZ.
3. Estudiar la relación entre la serología del virus HHV-6A/B y la respuesta clínica a distintos tratamientos para EM: INF- β , AG y NTZ.
4. Estudiar una posible predisposición genética al desarrollo de anticuerpos (IgG e IgM) frente al HHV-6A/B en relación al haplotipo HLA.
5. Estudiar una posible predisposición genética al desarrollo de anticuerpos (IgG e IgM) frente al HHV-6A/B en relación a SNPs situados en genes descritos en los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) relacionados con EM.

Materiales y métodos

Se ha realizado un estudio prospectivo de diseño longitudinal de seguimiento a 2 años sobre una población de 301 pacientes (196 mujeres y 105 hombres) diagnosticados de EM según los criterios de McDonald del 2010 sometidos a tres tipos de tratamientos: INF- β , AG y NTZ.

La determinación de los anticuerpos anti-HHV-6A/B (de clase IgG e IgM) se realizó mediante un método de ELISA de Panbio (*Inverness, Australia*) en muestras de suero recogidas justo antes de comenzar el tratamiento y a partir de ese momento, cada 6 meses durante los dos años de seguimiento del estudio. También se midieron los

anticuerpos anti-HHV-6A/B en muestras de suero recogidas cuando los pacientes sufrieron una recaída. Todas las muestras se midieron por duplicado realizándose 2 calibraciones por placa (cada 40 muestras) con un control negativo y positivo por calibración. Según las Unidades Panbio (PU) obtenidas, las muestras se clasificaron como positivas (> 11 PU), negativas (< 11 PU) o dudosas (9-11 PU). Las muestras dudosas fueron re-analizadas para clasificarlas como positivas o negativas.

En el caso de los pacientes tratados con interferones, se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes (NAb), ya que estos anticuerpos pueden reducir la biodisponibilidad del fármaco afectando a la respuesta clínica frente a él. La determinación de NAb se llevó a cabo en muestras de suero recogidas cada 6 meses a partir del inicio del tratamiento mediante un ensayo de efecto citopático, en el que se utilizaron dos líneas celulares (A549 y L929), tres tipos de IFN- β (*Betaferon*®, *Rebif*® y *Avonex*®) y el virus de la encefalomiocarditis murina.

También se ha realizado un análisis genético de los participantes en el estudio. Para ello, se extrajo el ADN a partir de leucocitos de sangre periférica mediante el método *salting out*. A cada paciente se le realizó el tipaje HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 mediante una PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid*) y en aquellos en los que se observó la presencia del haplotipo HLA-DRB1*02, se estudió la presencia del alelo DRB1*1501 (principal alelo de susceptibilidad para EM), llevando a cabo el genotipado del SNP rs3135388 (T/C) mediante PCR a tiempo real (rt-PCR) utilizando sondas Taqman®.

También se ha realizado el genotipado de 42 de los SNPs de los estudios GWAS que han sido relacionados con el riesgo de padecer EM. Este genotipado se realizó en el CEGEN mediante la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY Sequenom, que utiliza la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight*) para realizar la secuenciación de los SNPs.

Las variables clínicas utilizadas para evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, han sido la tasa anualizada de brotes y la variación de la puntuación EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) desde el inicio del tratamiento hasta completar los dos años de seguimiento.

En cuanto al análisis estadístico se han utilizado los programas SPSS Statistic® (versión 15.0) y STATCALC (Epi Info™ v.6.02; CDC, Atlanta, USA). Para el análisis de las variables cuantitativas se utilizaron los test no paramétricos de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon rechazándose la hipótesis nula cuando $p > 0.05$ y utilizándose la odds ratio (OR) como medida de asociación. El estudio de las variables cualitativas se realizó mediante tablas de contingencia utilizando la prueba Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de dos colas de Fisher's para la estimación de la significación estadística y la OR como medida de asociación.

Resultados:

Serología anti-HHV-6A/B en pacientes con EM y controles sanos

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de IgG entre pacientes con EM y controles sanos ($p = 0.005$).

Serología anti-HHV-6A/B en pacientes con EM en función del tratamiento

Se observó una reducción significativa del valor medio de los títulos de anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B ($p = 0.044$) y de IgM anti-HHV-6A/B ($p = 0.003$) entre los niveles basales y a los 24 meses de tratamiento. Al considerar los tratamientos por separado, en todos se produjo una reducción del valor medio de los títulos, aunque sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes tratados con natalizumab (IgG; $p = 0.033$ e IgM; $p = 0.024$) y en los pacientes tratados con IFN- β que no desarrollaron NABs durante el estudio (IgM; $p = 0.036$).

Serología anti-HHV-6A/B y respuesta clínica

El 57.8% de los pacientes incluidos en el estudio respondieron favorablemente al tratamiento, siendo el grupo de pacientes tratados con natalizumab donde se encontró el mayor número de respondedores (71.3%).

Se observó que en la mayoría de los pacientes en los que disminuyeron los títulos de IgG a lo largo del estudio se produjo una respuesta clínica favorable encontrándose diferencias estadísticamente significativas respecto a los pacientes en los que los anticuerpos IgG aumentaron ($p = 0.0000015$). Se observó además una relación entre el grado de aumento y disminución de los anticuerpos IgG y el número de respondedores. También se encontró asociación entre el aumento de los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B y la no-respuesta clínica (pacientes con al menos dos recaídas y/o un aumento de la puntuación EDSS de 1 punto).

Al evaluar la variación de los anticuerpos IgG anti-HHV6A/B respecto a la respuesta clínica de cada tratamiento por separado, se observó la misma tendencia en los tres, aunque las mayores diferencias se encontraron en los pacientes tratados natalizumab ($p = 0.0007$; O.R. = 7.9) y en los pacientes tratados con IFN- β que no desarrollaron NAb durante el estudio ($p = 0.0006$; O.R. = 4.9).

En cuanto a la serología IgM anti-HHV6A/B, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a la respuesta clínica.

Serología anti-HHV-6A/B y progresión de la enfermedad

También se encontró asociación entre los títulos de IgG anti-HHV-6A/B y la progresión de la enfermedad, ya que en los pacientes con peor evolución clínica se encontraron niveles de IgG más altos a los 24 meses ($p = 0.0033$), observándose además una disminución de los títulos de IgG en los pacientes que evolucionaron favorablemente ($p = 0.00002$; O.R. = 3.1). De nuevo, las mayores diferencias se encontraron en los

pacientes tratados con natalizumab ($p = 0.006$; O.R.= 3.0) y con IFN- β que no desarrollaron NAbs a lo largo del estudio ($p = 0.0005$; O.R. = 6.3).

En cuanto a la serología IgM anti-HHV-6A/B no se encontró asociación con la progresión de la enfermedad.

Serología anti-HHV-6A/B y brotes

Se encontró asociación entre la variación de anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B y la probabilidad de padecer una recaída ($p = 0.004$; O.R. = 2.0), observándose además un mayor riesgo de sufrir un brote cuando los títulos de IgG anti-HHV-6A/B fueron más altos a los 24 meses ($p = 0.021$).

Respecto a la variación de los anticuerpos antes de las recaídas, se observó un pico para los títulos de IgG anti-HHV-6A/B dos semanas antes del brote ($p = 0.0142$) y otro para los anticuerpos IgM anti-HHV-6A/B un mes antes ($p = 0.0344$).

Serología anti-HHV-6A/B y haplotipo HLA

El 70% de la población estudiada presentó títulos de IgG anti-HHV-6A/B entre 11 y 33 PU, aumentando este porcentaje hasta un 85% cuando se consideraron sólo los pacientes mayores de 40 años. Al estratificar la población por haplotipos, se observó que los pacientes portadores del alelo HLA-DR6 presentaron niveles significativamente más altos tanto para IgG ($p = 0.041$; O.R. = 4.2) como para IgM ($p = 0.00002$; O.R. = 11.32) que el resto de la población estudiada.

Serología anti-HHV-6A/B y SNPs-GWAS

De los 42 SNPs de los estudios de GWAS seleccionados por su relación con la EM, se ha encontrado asociación destacable en 9 de ellos. En 6 SNPs se encontró asociación con la serología anti-HHV-6A/B: rs10201872 (gen SP140); rs12368653 (gen CYP27B1); rs12466022 (gen no conocido); rs13333054 (gen IRF8); rs7200786 (gen

CLEC16A) y [rs79223837](#) (gen HHEX) y en 4 de ellos se encontró asociación con la evolución de la enfermedad y/o respuesta al tratamiento: [rs13333054](#) (gen IRF8); [rs2019960](#) (gen PVT1); [rs2243123](#) (gen IL12A) y [rs7522462](#) (gen KIF21B).

Discusión

Serología anti-HHV6A/B y evolución de la enfermedad

En nuestro estudio, hemos encontrado una mayor prevalencia y unos títulos significativamente más elevados de los anticuerpos IgG e IgM anti-HHV6A/B en pacientes con EM que en controles. Además se ha visto que la variación de los títulos de IgG a lo largo de la enfermedad podría estar asociada a su evolución, tanto a nivel de progresión, como del riesgo de sufrir recaídas pudiéndose relacionar por tanto, con la respuesta al tratamiento. Además se ha observado que la serología anti-HHV-6A/B podría ayudar a predecir las recaídas, ya que se observó un pico en los títulos tanto de IgG como de IgM antes de que se produjera un brote.

A pesar de que para los tres fármacos estudiados se ha encontrado asociación entre la variación de los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B y la respuesta al tratamiento, la mayor asociación se encontró en los pacientes tratados con natalizumab, pudiendo deberse este hecho a la acción directa de este fármaco en la síntesis de inmunoglobulinas producidas por las células B como respuesta a las infecciones virales.

Por tanto, y de acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, parece ser que la medida de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B podría ser un buen biomarcador clínico de la respuesta al tratamiento aunque serían necesarios más estudios para validar estos resultados.

Serología anti-HHV6A/B y genética

Las mayores diferencias en relación a la presencia de un haplotipo concreto de HLA y la serología anti-HHV-6A/B se ha observado en los portadores del alelo HLA-DR6, en los que se encontraron niveles de anticuerpos significativamente más altos para IgG y sobre todo para IgM (probabilidad 11 veces mayor de presentar positividad para IgM) que en el resto de la población estudiada, no pudiéndose relacionar sin embargo este hallazgo, con la tasa de recaídas ni con la progresión de la enfermedad. Por tanto, y debido a la pequeña cohorte de pacientes incluida en nuestro trabajo, serán necesarios más estudios para confirmar la posible implicación del haplotipo HLA-DR6 en la reactivación del HHV-6A/B.

En cuanto a los SNPs de GWAS estudiados, sólo se encontró asociación con la serología, la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en 9 de ellos. A pesar de que todos están relacionados de alguna manera con genes implicados en la respuesta inmune, hay que tener en cuenta que un hallazgo positivo para una determinada variante no debe interpretarse como un efecto directo con el gen donde se encuentra, haciendo falta más estudios para validar las asociaciones encontradas.

Conclusiones:

1. A pesar de ser un virus ubicuo, tanto la prevalencia como los títulos basales de IgG e IgM anti-HHV-6A/B son significativamente mayores en pacientes con EM que en la población libre de enfermedad.
2. La variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B se ha asociado a la progresión de la enfermedad, ya que se encontró un número significativamente mayor de pacientes libres de progresión cuando los títulos de IgG disminuyeron. Cuando los títulos de IgG aumentaron, se observó un número significativamente mayor

de pacientes en los que la enfermedad progresó a pesar de que todos ellos estaban recibiendo tratamientos modificadores de la enfermedad.

3. La variación de los títulos de IgG anti-HHV6A/B se ha asociado con el riesgo de sufrir brotes a lo largo de la enfermedad, ya que cuando los títulos de IgG disminuyeron, el número de pacientes libres de brotes fue significativamente mayor que cuando los títulos de IgG aumentaron.
4. La variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B se ha asociado con la respuesta al tratamiento, sobre todo en los pacientes tratados con NTZ, entre los que se encontró el mayor porcentaje de respondedores cuando los títulos de IgG disminuyeron (más del 70%).
5. El seguimiento serológico anti-HHV-6A/B en los pacientes con EM podría ayudar a predecir cuándo un paciente va a experimentar una recaída, ya que los títulos aumentaron progresivamente hasta alcanzar un máximo, dos semanas (IgG) o un mes antes (IgM) de que se produjera un brote.
6. Se ha encontrado una fuerte asociación para la positividad de IgM anti-HHV-6A/B con los portadores del haplotipo HLA-DR6, sugiriendo un posible papel de este alelo en la reactivación del virus.
7. Se ha encontrado asociación entre la serología anti-HHV-6A/B, la evolución de la EM y/o la respuesta al tratamiento en los portadores del alelo minoritario en 9 de los 42 SNPs-GWAS estudiados. Aunque todos los SNPs en los que se ha encontrado algún tipo de asociación han sido relacionados con mecanismos patogénicos implicados en la EM (sistema inmune, mecanismos degenerativos, mecanismos de daño axonal, metabolismo de la vitamina D...), serían necesarios más estudios para confirmar dicha asociación.

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is a demyelinating and neurodegenerative chronic inflammatory disease that selectively affects the central nervous system (CNS). Mainly it develops in young adults (25-30 years) and is characterized by the appearance of focal lesions in the white matter (plaques). In these lesions demyelination and axonal destruction can be observed with infiltration of a large number of inflammatory cells. In the formation and progression of the inflammatory lesion, both T lymphocytes that cross the blood-brain barrier and act on the cerebral parenchyma, such as B lymphocytes, contribute to the demyelination process through the secretion of antibodies.

MS has cognitive disorders and motor and sensory symptoms. The severity of symptoms and disease progression rely heavily affected neuronal populations, so the most striking feature in MS is the heterogeneity in their clinical manifestation and evolution. This means that the differential diagnosis with other neurological diseases should be established by complementary paraclinical studies to the neurological examination (magnetic resonance, oligoclonals bands in cerebrospinal fluid analysis and visual evoked potentials). Classically, patients are grouped according to four types of MS (Relapsing-Recurrent MS, Secondary-Progressive MS, Primary-Progressive MS and Primary-Recurrent MS) described depending on the number of episodes of neurological dysfunction (relapses), the time between them and functional sequelae left in the patient.

The therapeutic management of patients with MS is performed by immunomodulatory therapies, first treating acute relapses (corticosteroids, ACTH) and secondly, immunotherapies administering chronically to stop inflammation that was produced over time. Treatment usually begins with non-aggressive drugs (beta-interferon, glatiramer acetate...) until progression of disease and/or an increase in relapses, at

which point it start to administer drugs which have seen greater therapeutic potency (natalizumab, fingolimod...), but also are associated with more complex side effects.

The etiology of MS is still unknown. Currently, the most accepted pathogenic hypothesis suggests that MS is triggered in genetically predisposed subjects who are affected by an environmental factor, which would act in the early stages of life (before adolescence) and would initiate an abnormal autoimmune process producing inflammation of the myelin and axonal-neural degeneration leading to the appearance of lesions characteristic of the disease.

At the genetic level, studies to date suggest that genes that are primarily associated with the risk of disease, are in the major histocompatibility complex (MHC), fundamentally the HLA-DR2 allele HLA-DRB1 gene, which was first associated with MS. Outside this region, studies of genome-wide association (GWAS) have found other susceptibility genes, but it has seen that its contribution to the overall risk is relatively low.

Regarding responsible for the disease is a viral infection, but so far has not been possible to identify a specific virus as the trigger for the autoimmune response associated with MS. The three candidates who have accumulated more evidences are human endogenous retroviruses and two members of the *Herpesviridae* family (the Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6). The fact that these viruses have been repeatedly associated with MS, it is because after a primary infection in childhood or adolescence, remain dormant and suffer periodic reactivations over time that can be related to the relapses of MS.

Specifically, the HHV-6A/B is a ubiquitous and neurotropic virus: after primary infection is latent in circulating mononuclear peripheral blood cells, reactivating periodically and causing serious neurological complications. However, although there are many studies

linking this virus with MS, a causal role of HHV-6A/B in the disease has not yet been established probably due to its high prevalence in healthy population.

Hypothesis

Numerous studies have documented the neurotropic capacity of HHV-6A/B and also found higher levels of this virus in MS patients than in healthy CNS, in PBMCs, CSF and serum subjects, indicating that could have an important role in MS.

Serology of HHV6A/B is a reflection of the immune response against the virus, so involvement of HHV6A/B in MS could be related to levels of antibodies against it. Moreover, as the different treatments for MS act on the immune system, there may be a correlation between levels of antibody titers against HHV-6A/B and the response to treatment and disease progression.

Objectives:

1. To study the variation of HHV-6A/B virus titers in relation to the progression of MS during two years of follow-up in patients treated with interferon- β (INF- β), glatiramer acetate (GA) and natalizumab NTZ).
2. To study the variation of HHV-6A/B virus titers in relation to the annualized rate of relapses during two years of follow-up in patients treated with INF- β , GA and NTZ.
3. To study the relationship between HHV-6A/B virus serology and the clinical response to different treatments for MS: INF- β , GA and NTZ.
4. To study a possible genetic predisposition to the development of IgG and IgM HHV-6A/B antibodies relative to HLA.
5. To study a possible genetic predisposition to the development of IgG and IgM HHV-6A/B antibodies regarding SNPs located in genes described in studies of genome-wide association (GWA) related to MS.

Materials and methods

We performed a prospective longitudinal study of 2 years of follow-up on a population of 301 patients (196 women and 105 men) diagnosed with MS according to the McDonald criteria 2010 under three types of treatments: INF- β , AG and NTZ.

The determination of anti-HHV-6A/B antibodies (IgG and IgM) was performed using an ELISA method Panbio (*Inverness, Australia*) in serum samples collected just before starting treatment and thereafter, every 6 months during the two-year follow-up study. Anti-HHV-6A/B antibodies were also measured in serum samples collected when patients relapsed. All samples were measured in duplicate by performing two calibrations plate (every 40 samples) with a negative and positive control for calibration. According Panbio Units (PU) obtained, samples were classified as positive (> 11 PU), negative (<11 PU) or doubtful (9-11 PU). Doubtful samples were re-analyzed to classify them as positive or negative.

For patients treated with interferon, the presence of neutralizing antibodies (NAbs) was carried out, as these antibodies may affect the clinical response to INF- β . Quantification of NAbs was performed in serum samples collected every 6 months from treatment initiation using a cytopathic effect assay, in which two cell lines (A549 and L929), three types of INF- β (*Betaferon®*, *Rebif®* and *Avonex®*) and the murine encephalomyocarditis virus were used.

It was also performed a genetic analysis of study participants. For this, the DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by salting out method.

The HLA-DRB1, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 typing were performed on each patient by a PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid*) and in those in which the presence of HLA-DRB1*02 haplotype was observed, the presence

of the DRB1*1501 allele (main susceptibility allele for MS) was studied, carrying out rs3135388 SNP (T/C) genotyping by real-time PCR (rt-PCR) using Taqman® probes. It has also performed genotyping of 42 SNPs of GWAS that have been linked to risk of MS. Genotyping was performed on CEGEN by iPLEX® Gold Sequenom MassArray technology using mass spectrometry MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight*) for sequencing the SNPs.

The clinical variables used to assess disease progression and response to treatment have been annualized relapse rate and the change in EDSS score (*Expanded Disability Status Scale*) from the start of treatment to complete the two year follow-up.

Statistical analysis was performed with SPSS Statistic® (version 15.0) and STATCALC (Epi Info™ v.6.02; CDC, Atlanta, USA). For quantitative variables, Kruskal-Wallis and Wilcoxon non-parametric tests were used, rejecting the null hypothesis when $p > 0.05$ and using the odds ratio (OR) as a measure of association. The study of the qualitative variables was done using contingency tables using the Pearson Chi-square test or the Fisher's two-tailed test for the estimation of statistical significance and the OR as a measure of association.

Results:

[Anti-HHV-6A/B serology in patients with MS and healthy controls](#)

Statistically significant differences in the prevalence of IgG from MS patients and healthy controls ($p = 0.005$) were found.

[Anti-HHV-6A/B serology in patients with MS according to the treatment](#)

A significant reduction of the average anti-HHV-6A/B IgG antibody titers ($p = 0.044$) and IgM anti-HHV-6A/B ($p = 0.003$) between baseline and 24 months was observed.

When considering treatments separately, there were a reduction in the mean value of the titers, although only statistically significant differences were found in patients treated with natalizumab (IgG, $p = 0.033$ and IgM, $p = 0.024$) and in patients treated with IFN- β who did not develop NAb during the study (IgM; $p = 0.036$).

[Anti-HHV-6A/B serology and clinical response](#)

Most patients included in the study (57.8%) responded to treatment, overall those treated with natalizumab (71.3%).

It was observed that most patients who decreased IgG titers throughout the study were clinical responders with statistically significant differences when comparison was made with patients in which IgG antibodies increased ($p = 0.0000015$). We also observed a relationship between the degree of increase and decrease of IgG antibodies and the number of responders. In addition we found an association between the increase in anti-HHV-6A/B IgG antibodies and non-clinical response (patients with at least two relapses and/or a 1-point EDSS score increase).

In evaluating the variation of IgG HHV6A/B antibodies regarding the clinical response of each treatment separately, the same trend was observed in all of them, although the largest differences were found in patients receiving natalizumab ($p = 0.0007$; OR = 7.9) and in patients treated with IFN- β who did not develop NAb during the study ($p = 0.0006$; OR = 4.9).

As for anti-HHV6A/B IgM serology, no statistically significant differences were found in relation to the clinical response.

[Anti-HHV-6A/B serology and disease progression](#)

Association was also found between anti-HHV-6A/B IgG titers and disease progression. In patients with a worse clinical outcome were found higher IgG levels at 24 months ($p = 0.0033$), and we also observed a decrease in IgG titers in patients who

were clinical responders ($p = 0.00002$; OR = 3.1). Again, the greatest differences were found in patients treated with natalizumab ($p = 0.006$; O.R. = 3.0) and with IFN- β who did not develop NAb throughout the study ($p = 0.0005$; O.R. = 6.3).

We found no association of anti-HHV-6A/B IgM serology with disease progression.

Anti-HHV-6A/B and relapses

Association was found between the variation in anti-HHV-6A/B IgG titers and the probability of suffering a relapse ($p = 0.004$; OR = 2.0). We also observed a greater risk of a relapse when anti-HHV-6A/B IgG titers were higher at 24 months ($p = 0.021$). Regarding antibody variation prior to relapse, a peak was observed for anti-HHV-6A/B IgG titers two weeks before the relapse ($p = 0.0142$) and another for anti-HHV-6A/B IgG titers one month before ($p = 0.0344$).

Anti-HHV-6A/B serology and HLA haplotype

Most of the study population had titers of anti-HHV-6A/B IgG between 11 and 33 PU, increasing this percentage to 85% when considered only patients over 40 years. When stratifying the population haplotypes we observed that patients having HLA-DR6 had significantly higher levels of both IgG ($p = 0.041$; OR = 4.2) and IgM ($p = 0.00002$; OR = 11.32) antibody titers than the rest of the study population.

Anti-HHV-6A/B and SNPs-GWAS

Of the 42 SNPs selected from GWAS studies for its relationship with MS, strong associations were found in 9 of them. In 6 SNPs association with the anti-HHV-6A/B serology was found: rs10201872 (SP140 gene); rs12368653 (CYP27B1 gene); rs12466022 (gene not known); rs13333054 (IRF8 gene); rs7200786 (CLEC16A gene) and rs79223837 (HHEX gene) and in 4 of them association with disease evolution and/or response to treatment was found: rs13333054 (IRF8 gene); rs2019960 (PVT1 gene); rs2243123 (IL12A gene) and rs7522462 (KIF21B gene).

Discussion

Anti-HHV-6A/B and disease progression

In our study, we found a higher prevalence and significantly higher titers of anti-HHV6A/B IgG and IgM antibodies in MS patients than in controls. In addition it has been found that the variation in IgG titers may be associated with the evolution of the disease, both in progression and in the risk of relapses and therefore with the clinical response to the different treatments. Furthermore it has been observed that anti-HHV-6A/B serology may help to predict relapses, since a peak was observed in titers of both IgG and IgM before a relapse occurs.

Although for the three drugs studied we found an association between the variation of HHV-6A/B IgG antibodies and the response to treatment, the higher signification was found in patients treated with natalizumab. This may be due to direct action of this drug in the synthesis of immunoglobulins produced by B cells in response to viral infections.

Therefore, and according to the data obtained in this work, it appears that the measurement of anti-HHV-6A/B IgG titers could be a good clinical biomarker of response to treatment, although a validation would be needed.

Anti-HHV-6A/B and genetics

The greatest differences in relation to the presence of a particular HLA haplotype and anti-HHV-6A/B serology have been observed in HLA-DR6 carriers because levels were significantly higher for IgG antibodies and especially for IgM antibodies (11 times more likely to present IgM positivity); however, this finding was not related with relapses or with the progression of the disease. Therefore, due to the small cohort of patients included in our study, further studies will be necessary to confirm the possible implication of the HLA-DR6 haplotype in the reactivation of HHV-6A/B.

Regarding GWAS SNPs studied, only association with serology, disease progression and/or response to treatment in 9 of them was found. Although all of them are related in some way with genes involved in immune response, a positive finding for a particular variant should not be interpreted as a direct effect with the gene where it is, being necessary to carry out more studies to validate these possible associations.

Conclusions:

1. Despite being a ubiquitous virus, both the prevalence and the basal titers of anti-HHV-6A/B IgG and IgM are significantly higher in patients with MS than in the disease-free population.
2. Variations of anti-HHV-6A/B IgG titers has been associated with disease progression as significantly more patients free of progression were found when IgG titers decreased. When IgG titers increased, we observed a significantly higher number of patients with disease progression despite being undergoing disease modifying treatments.
3. Anti-HHV6A/B IgG titers variations have been associated with the risk of relapses throughout the disease, since when IgG titers decreased, the number of patients without relapses was significantly higher than when titers of IgG increased.
4. Variations of anti-HHV-6A/B IgG titers have been associated with response to treatment, especially in patients treated with NTZ, including the higher percentage of responders when IgG titers decreased (more 70%).
5. Serological monitoring anti-HHV-6A/B in patients with MS could help to predict when a patient will experience a relapse because titers increased progressively up to a maximum of two weeks (IgG) or one month before (IgM) that a relapse occurred.

6. A strong association was found for anti-HHV-6A/B IgM positivity with HLA-DR6 haplotype carriers, suggesting a possible role of this allele in virus reactivation.
7. An association between anti-HHV-6A/B serology, the course of MS and/or response to treatment in carriers of minor allele in 9 of the 42 SNPs-GWAS studied was found. Although these SNPs have been linked to pathogenic mechanisms involved in MS (immune system, degenerative mechanisms, mechanisms of axonal damage, metabolism of vitamin D ...), more studies would be needed to confirm this association.

INTRODUCCIÓN



La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante y neurodegenerativa que afecta selectivamente al Sistema Nervioso Central (SNC) causando disfunción generalizada. Se desarrolla fundamentalmente en adultos jóvenes, constituyendo, dentro de esta población, la segunda enfermedad neurológica más frecuente en Europa y Norteamérica después de los traumatismos craneoencefálicos. Se caracteriza por la aparición de lesiones focales en la sustancia blanca (placas), en la que lo más llamativo es la desmielinización y la destrucción axonal en grado variable asociadas a la actividad inflamatoria^{1,2}.

Como consecuencia de la pérdida de mielina y la neurodegeneración, la enfermedad cursa con alteraciones cognitivas y síntomas motores y sensitivos. El tipo y gravedad de los síntomas, así como la evolución de la enfermedad depende en gran medida de las poblaciones neuronales afectadas.

A pesar de ser una entidad clínica bien descrita desde hace más de un siglo, todavía se desconoce la etiología de esta enfermedad. En la actualidad, la hipótesis patogénica más aceptada dice que la EM se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos sobre los que incide un factor ambiental, hasta la fecha desconocido, que pone en marcha un proceso inmune anormal que sería el causante de la inflamación presente en las lesiones que caracterizan esta enfermedad.

1. Patogenia

La EM es una enfermedad autoinmune en la que se produce la destrucción de la vaina de mielina que recubre los axones, lo que genera un retraso en la transmisión de los impulsos nerviosos a través de las neuronas afectadas.

Se han propuesto múltiples mecanismos mediante los que el sistema inmunitario produce el daño a la mielina, pero en todos, parece ser que los linfocitos T (LTs) juegan un papel esencial. Así, la enfermedad comienza con una fase aguda en la que se activan los LTs CD4+ frente a la mielina de los nervios periféricos. La forma en la que estos LTs autorreactivos se activan, todavía es incierta, postulándose como mecanismo potencial, el mimetismo molecular, donde se generan LTs contra epítomos no propios (antígenos virales o microbianos) que tienen reacción cruzada contra epítomos propios de la mielina^{3,4}. Esta respuesta inmunológica provoca la liberación de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión que facilitan el paso de los LTs CD4+ autorreactivos al interior del parénquima cerebral. Una molécula de adhesión clave en la extravasación leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica (BHE) es la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4; *very late antigen-4*) que se expresa en la superficie de los linfocitos activados e interactúa con las moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*) expresada en las células endoteliales capilares^{5,6}. Una vez dentro del SNC, los LTs CD4+ son reactivados por antígenos de la mielina presentados por moléculas de HLA (antígeno leucocitario humano) de clase II presentes en la superficie de células presentadoras de antígeno como macrófagos y microglía. Esta reactivación desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-23 o TNF- α , que alteran aún más la BHE y estimulan el reclutamiento al SNC de otras células inflamatorias como monocitos, LTs CD8+, linfocitos B (LBs) y mastocitos de sangre periférica, que contribuyen a la formación y progresión de la lesión inflamatoria. Como consecuencia de este proceso, en el infiltrado inflamatorio

de las lesiones del SNC, se puede observar un alto número de LTs CD8+, sugiriéndose que podrían tener un papel importante en el daño axonal provocado por su activación llevada a cabo por moléculas HLA de clase I⁷. En cuanto a los LBs, se considera que la inmunidad humoral también desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la EM. De hecho, existe una producción intratecal persistente de inmunoglobulinas oligoclonales en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EM, hallazgo que actualmente forma parte de los criterios diagnósticos de la enfermedad⁸. Además, los LBs participan directamente en el proceso de desmielinización al secretar anticuerpos patogénicos dirigidos contra oligodendrocitos⁹ (*Figura 1*).

Debido a esta respuesta inmunológica, en los pacientes con EM aparecen lesiones a lo largo de todo el SNC que presentan infiltración de un gran número células inflamatorias y que pueden verse mediante técnicas de imagen convencional como la resonancia magnética (RM) apareciendo como zonas de desmielinización con un borde nítido que las separa del resto del tejido encefálico mielinizado (*Figuras 2-4*). Durante la progresión de la enfermedad, la inflamación va provocando daño axonal, de manera que al final del proceso degenerativo, las lesiones que comenzaron con la destrucción de la vaina de mielina, y acabaron produciendo daño axonal, se convierten en placas escleróticas, que son las que dan nombre a la enfermedad. Estas placas, se ubican a lo largo de diferentes zonas del encéfalo y de la médula espinal, de forma que la localización de las lesiones desmielinizantes a nivel del SNC determina los signos y síntomas de la enfermedad, siendo el aspecto clínico más llamativo de la EM, su heterogeneidad en cuanto a su manifestación clínica y progresión.

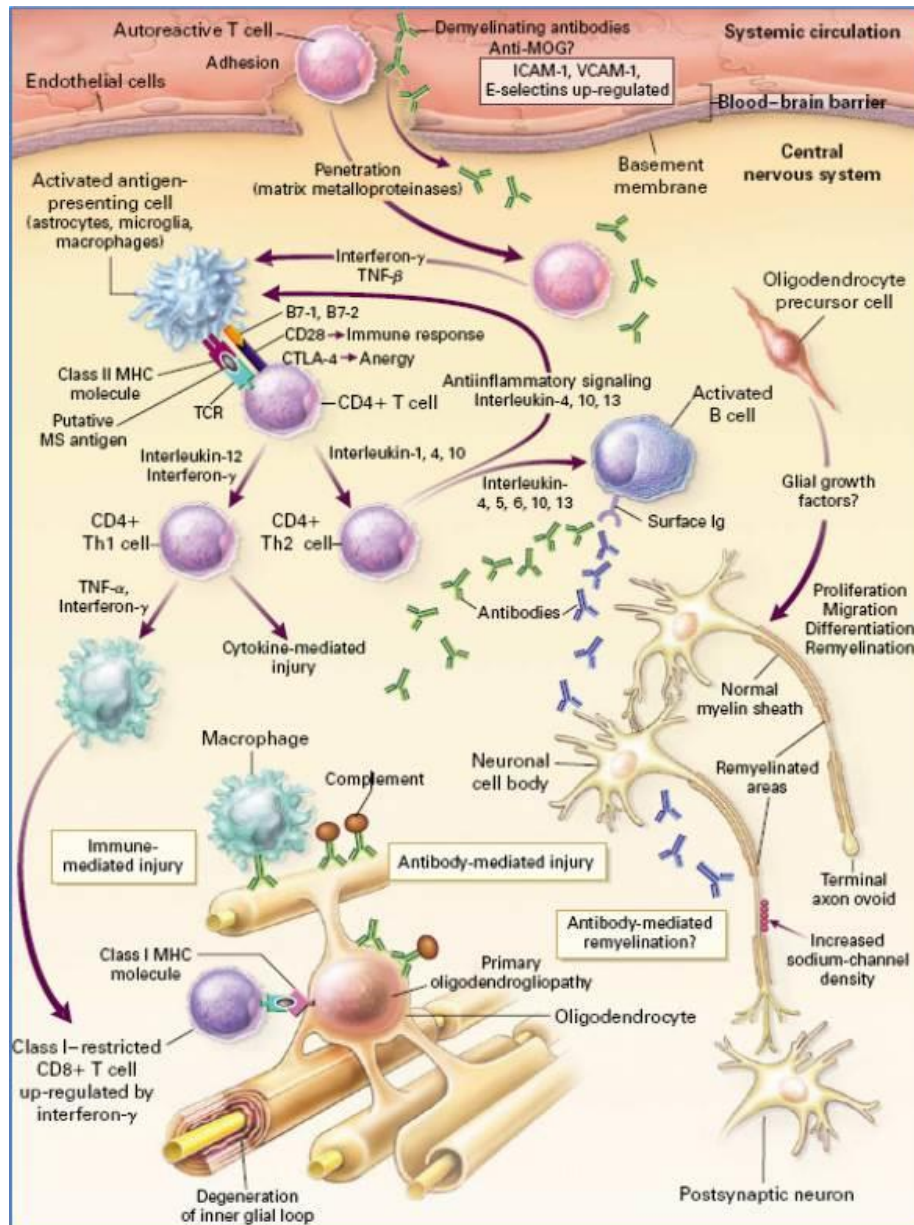


Fig 1. Immunopatogénesis de la EM. Figura extraída de Noseworthy et al.

Habitualmente, el curso clínico de la enfermedad se caracteriza por la aparición de episodios de disfunción neurológica (más o menos reversibles) que se repiten con el tiempo, y que a medida que se repiten, van dejando secuelas funcionales. Suelen afectarse la mayoría de los sistemas funcionales neurológicos (piramidal, sensitivo, cerebeloso, tronco cerebral, esfinteriano, visual y mental), siendo las alteraciones motoras (90%), sensitivas (77%) y cerebelosas (75%) las más frecuentes.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, las más habituales son: alteraciones oculares (como la neuritis óptica o la oftalmoplejía internuclear), afectación motora y/o sensitiva, alteraciones esfinterianas y sexuales y síntomas inespecíficos como la fatiga o el dolor. Entre el 45-65% de los pacientes, también pueden presentar déficits cognitivos que abarcan desde la lentitud en el pensamiento (bradipsiquia) hasta demencia progresiva.

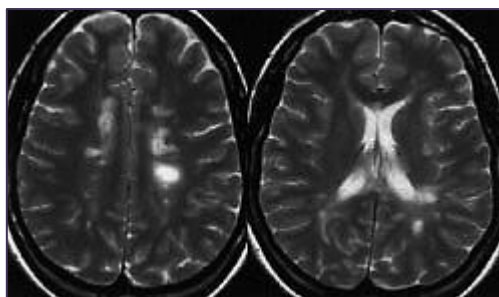


Fig 2. Secuencia transversal en T2 de paciente con EM clínicamente definida. Se observan lesiones características en situación periventricular, algunas de morfología ovoidea.

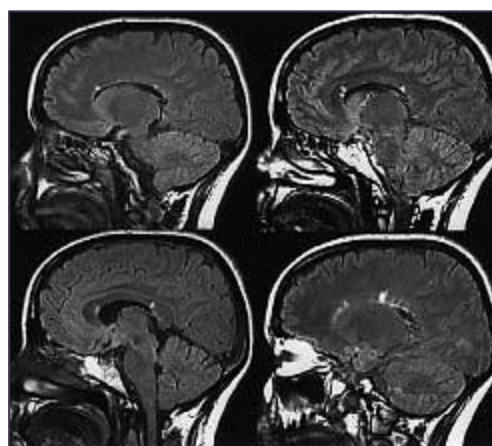


Fig 3. Paciente con un primer episodio sugestivo de enfermedad desmielinizante. Se observan lesiones focales hiperintensas periventriculares y en la superficie subependimaria del cuerpo calloso.



Fig 4. Paciente con un primer episodio de enfermedad desmielinizante. La RM muestra una lesión desmielinizante en el suelo del IV ventrículo afectando el fascículo longitudinal medial.

2. Formas clínicas

Tanto el debut como el curso clínico de la EM son muy heterogéneos. De hecho, la progresión de la enfermedad puede variar desde episodios aislados distribuidos en años, hasta una evolución tan rápida que acabe con la vida del paciente en cuestión de meses.

Debido a esto, por consenso internacional, se han establecido 4 modelos principales de progresión en función del debut y la evolución^{10,11} (*Figura 5*):

- **EM Remitente-Recurrente (EM-RR):** se caracteriza por un comienzo abrupto y un curso de la enfermedad en forma de brotes, es decir, con episodios agudos de empeoramiento de la sintomatología que se van alternando con periodos de remisión, en los que se recuperan parcial o totalmente las capacidades perdidas.
- **EM Secundaria-Progresiva (EM-SP):** se caracteriza por la falta de mejoría de los síntomas después de cada brote, de manera que llega un momento que no es posible distinguir entre un brote y el siguiente, observándose un empeoramiento progresivo de la enfermedad.
- **EM Primaria-Progresiva (EM-PP):** se caracteriza por un deterioro continuo y progresivo desde el inicio de la enfermedad sin existir remisiones.
- **EM Progresiva-Recurrente (EM-PR):** se caracteriza por una evolución similar a la EM-PP, pero en este caso, se añaden recaídas con o sin recuperación completa, de forma que en los periodos entre brotes existe una progresión continua de la enfermedad.

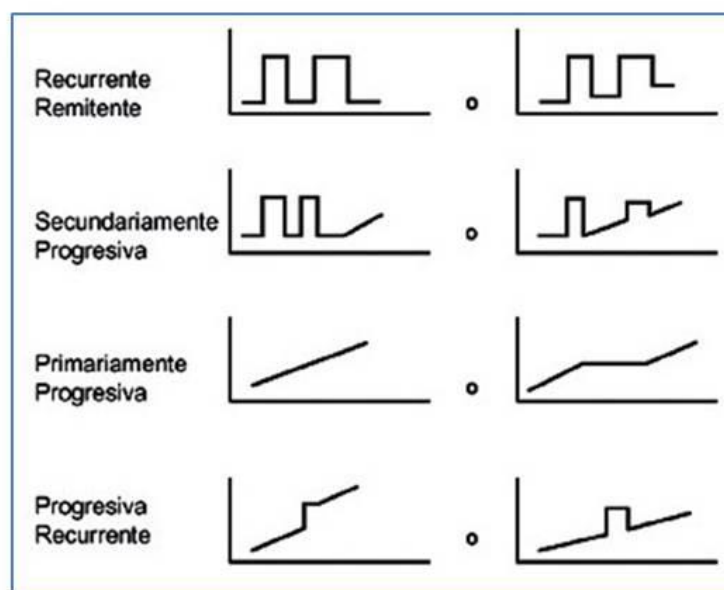


Fig 5. Modalidades evolutivas de la EM, según diagramas de Lublin.

El 90% de los pacientes debutan con EM en forma de brotes (EM-RR), pero a medida que avanza la enfermedad, entre un 30-50% pasan del curso en brotes a un curso progresivo (EM-PS). Un 10% muestran un curso progresivo desde el comienzo (EM-PP), siendo ésta la forma más agresiva de la enfermedad. Entre los pacientes que debutan con un modo progresivo, de un 1% a un 5%, además presentan un patrón clínico de brotes con recuperación parcial (EM-PR). Se ha observado que la edad de comienzo de la enfermedad, es igual para las formas en brotes y las formas progresivas secundarias, pero es significativamente mayor para las formas progresivas primarias (45 años).

Actualmente, también se incluyen como parte del espectro clínico de la EM, síndromes clínicos desmielinizantes aislados (CIS, “clinical isolated syndrome”) del nervio óptico (neuritis óptica desmielinizante), médula espinal (mielitis transversa) o del tronco del encéfalo, debido al alto porcentaje de estos síndromes que desembocarán en una EM clínicamente definida.

3. Diagnóstico

El diagnóstico de la EM resulta complejo debido a que las manifestaciones clínicas de la enfermedad son altamente variables, por el hecho de que las lesiones desmielinizantes pueden aparecer en cualquier parte del SNC afectando a poblaciones neuronales muy diversas. Sin embargo, existen zonas por las que muestran cierta predilección (zonas periventriculares, nervio y quiasma óptico, tronco cerebral, pedúnculos cerebelosos y médula), que configuran una serie de síntomas más o menos característicos que permiten el reconocimiento de la enfermedad. A pesar de existir una serie de evidencias clínicas que pueden hacer sospechar la existencia de EM en determinados pacientes, el diagnóstico diferencial respecto a otras enfermedades neurológicas se establece mediante estudios paraclínicos complementarios, utilizándose habitualmente:

- **Resonancia magnética (RM):** permite evidenciar lesiones desmielinizadas no sospechadas clínicamente y determinar su diseminación espacial (presencia de más de una lesión) y temporal (aparición de nuevas lesiones). Las imágenes de RM muestran anormalidades focales en la materia blanca en más del 95% de los pacientes de EM¹².
- **Análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR):** se observa una elevación de las inmunoglobulinas, preferentemente IgG, respecto a las demás proteínas del LCR. Ligado a la elevación de IgG, está el hallazgo de bandas oligoclonales por isoelectroenfoque que sugieren síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Se observa en aproximadamente el 90% de los pacientes¹³.

- **Potenciales visuales evocados (PVE):** son potenciales eléctricos generados en el SNC tras la estimulación de un órgano sensitivo/sensorial periférico. Se pueden usar para localizar sitios de patología y medir la velocidad de conducción a lo largo de las vías sensoriales¹⁴.

Durante las dos últimas décadas, los criterios diagnósticos más utilizados fueron los establecidos por Poser *et al.*¹⁵, que permitían el diagnóstico de los pacientes con EM según el número de brotes y el análisis del LCR. Sin embargo, a partir del año 2001, McDonald *et al.*¹⁶ revisaron los criterios de Poser e integraron las imágenes de RM en el diagnóstico de la EM. A partir de entonces, se han realizado una serie de revisiones a la hora de considerar las imágenes de RM, de manera que las últimas que se hicieron fueron en el 2010, estableciéndose los criterios diagnósticos que se siguen actualmente¹⁷.

Criterios de McDonald 2010 para el diagnóstico de esclerosis múltiple	
Presentación clínica	Datos adicionales para el diagnóstico de EM
≥ 2 ó más ataques ^a , evidencia clínica de ≥ 2 lesiones o evidencia objetiva de 1 lesión con evidencia histórica razonable de un ataque previo ^b	Ninguno ^c
≥ 2 ó más ataques ^a , evidencia clínica objetiva de 1 lesión	<u>Diseminación en el espacio, demostrada por:</u> ≥ lesión en T2 en al menos 2 de 4 regiones típicas de EM en el SNC (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o en médula espinal) ^d o esperar a un nuevo ataque ^a clínico que implique un sitio diferente en el SNC
1 ataque ^a , evidencia clínica objetiva de ≥ 2 lesiones	<u>Diseminación en el tiempo, demostrada por:</u> Presencia simultánea de realce con gadolinio asintomático y lesiones no captantes en cualquier momento o una nueva lesión en T2 o captante con gadolinio en el seguimiento con resonancia magnética, independiente del tiempo con referencia al estudio previo, o esperar a un segundo ataque clínico ^a
1 ataque ^a , evidencia clínica objetiva de 1 lesión (síndrome clínico aislado)	<u>Diseminación en tiempo y espacio demostrada por:</u> <u>Espacio:</u> ≥ 1 lesión en T2 en al menos 2 de 4 regiones típicas de EM en el SN (periventricular, yuxtacortical, infratentorial o en médula espinal) ^d o esperar a un nuevo ataque clínico que implique un sitio diferente en el SNC <u>Tiempo:</u> presencia simultánea de realce con gadolinio asintomático y lesiones no captantes en cualquier momento o una nueva lesión en T2 o captante con gadolinio en el seguimiento con resonancia magnética, independiente del tiempo con referencia al estudio previo, o esperar a un segundo ataque clínico ^a
Progresión neurológica insidiosa sugestiva de EM (EM primaria progresiva)	<u>Un año de progresión (retro o prospectivamente) más 2 de 3 de los siguientes criterios^d:</u> - Evidencia de diseminación en el espacio en el cerebro basado en ≥ 1 lesión en T2 en regiones características de EM (periventricular, yuxtacortical o infratentorial) - Evidencia de diseminación en el espacio en la médula espinal basado en ≥ 2 lesiones en T2 a nivel espinal - LCR positivo (bandas oligoclonales o índice de IgG elevado)

^a Un ataque se define como la observación objetiva de eventos neurológicos agudos que se mantienen más de 24 h en ausencia de fiebre o infección; un ataque debe ser corroborado con el examen neurológico.

^b El diagnóstico clínico se basa en hallazgos objetivos de 2 ó más ataques o historia razonable de un ataque en el pasado que deben ser apoyados por hallazgos objetivos.

^c No se requieren estudios adicionales, sin embargo, es deseable que cualquier diagnóstico de EM sea hecho con acceso a imágenes basadas en estos criterios, si la imagen o algún otro examen son negativos debe tenerse cuidado antes de hacer el diagnóstico de EM y deben considerarse diagnósticos diferenciales.

^d Las lesiones que realcen con gadolinio no son necesarias, las lesiones sintomáticas son excluidas de consideración en sujetos con síndromes en tallo cerebral y médula espinal.

4. Tratamiento

Todos los subtipos de EM aparecen fisiológicamente relacionados con el sistema inmune (SI), por lo que el manejo de los pacientes se realiza mediante terapias inmunomoduladoras encaminadas a parar la inflamación asociada al curso de la enfermedad. Por un lado, se trata la inflamación que se produce en el brote agudo mediante corticoides y ACTH y por otro, se administran inmunoterapias de forma crónica para frenar la inflamación que se va produciendo a lo largo del tiempo y que acaba formando las placas de desmielinización. Se ha visto que la placa de EM puede prevenirse mejor cuanto más precozmente se interfiera en los mecanismos que van a llevar a la lesión final, ya sea actuando a nivel de la activación de los linfocitos T colaboradores, a su migración a través de la BHE y/o directamente a nivel de la destrucción mielínica-axonal.

Existen varios fármacos que han demostrado su eficacia reduciendo la tasa de recaídas, frenando la progresión de la enfermedad y disminuyendo las lesiones observables mediante RM. Habitualmente, la estrategia que se sigue consiste en iniciar el tratamiento con medicamentos poco agresivos, hasta que se observa en los pacientes una progresión de la enfermedad y/o un aumento de la tasa anualizada de brotes, momento en el cual se empiezan a administrar fármacos más agresivos. Este tipo de tratamientos de segunda línea, sólo se utiliza en pacientes refractarios a los tratamientos iniciales o en los pacientes con un curso más agresivo de la enfermedad desde el inicio, ya que la mayor potencia terapéutica también lleva asociada efectos secundarios más complejos.

Debido a que más del 50% de los pacientes sometidos a los tratamientos de primera línea experimentan una respuesta clínica inadecuada o subóptima, actualmente uno de los objetivos prioritarios de las investigaciones llevadas a cabo en EM, es encontrar biomarcadores que permitan personalizar los tratamientos para poder elegir el mejor

fármaco en cada paciente no retrasando el uso de modificadores de la enfermedad de segunda línea en individuos refractarios a los tratamientos iniciales (*Tabla 1*).

4.1. Tratamientos de primera línea

Los primeros modificadores de la enfermedad aprobados para el tratamiento de EM-RR fueron los interferones (IFN- β)¹⁸⁻²⁰ y el acetato de glatirámico (AG)²¹⁻²³, con los que se llegaban a conseguir disminuciones de las tasas anualizadas de los brotes en torno al 30-35%. También se ha visto, que en los pacientes con un primer episodio desmielinizante (CIS) y con RM característica de EM, tanto el IFN- β como el AG retrasan el tiempo hasta la aparición de un segundo brote y disminuyen el porcentaje de pacientes con conversión a EM clínicamente definida^{25,26}. Los estudios de seguimiento y comparación de estos dos fármacos, han mostrado que tienen una efectividad semejante y que su uso es seguro a largo plazo, por lo que tanto el IFN- β como el AG son los fármacos utilizados habitualmente como tratamiento de inicio en los pacientes de EM.

Sin embargo, a pesar de su eficacia, uno de los inconvenientes que presentan es que se trata de fármacos inyectables, lo que dificulta en muchos casos la administración por los propios pacientes. En los últimos años la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EMA (*European Medicines Agency*) han aprobado dos fármacos de administración oral como terapias de primera línea para el tratamiento a largo plazo de las formas recurrentes de EM. Se trata de la teriflunomida (*Aubagio®*) con una dosis diaria por vía oral^{33,34} y el dimetilfumarato (*Tecfidera®*) antes conocido como BG-12 que se toma dos veces al día^{35,36}.

- INTERFERONES

Los interferones (IFNs) son una familia de glicoproteínas producidas por las células del SI como respuesta a una infección viral. Se clasifican en tipo I (leucocitario y fibroblástico) y tipo II (inmune). Hay cuatro variantes de interferón tipo I, todos ellos monómeros (alfa, beta, omega y tau) y una variedad del tipo II que es un dímero (gamma).

Específicamente, para el tratamiento de la EM, se utilizan dos subtipos de IFN- β (IFN β -1b e IFN β -1a) que pueden administrarse por vía intramuscular o subcutánea. Los niveles séricos se mantienen más tiempo por la vía intramuscular, pero en los casos en que se requieren inyecciones frecuentes, la vía más práctica es la subcutánea, ya que permite la administración por el propio paciente. Pueden actuar a distintos niveles, tales como la inhibición de la activación y la coestimulación de LTs, la modulación de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias, la disminución de la migración de LTs, la supresión de la diferenciación de linfocitos Th17 y la estimulación de la producción de NGF (*nerve growth factor*) en estadios tempranos de la enfermedad (*Figura 6*). Entre los efectos secundarios que producen, el más frecuente es la aparición de un cuadro pseudogripal caracterizado por fatiga, fiebre y mialgias, que disminuye progresivamente en el curso del tiempo y es dependiente de la dosis. Al tratarse de sustancias recombinantes, todos los IFNs inducen el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (NAbs), pudiéndose producir una disminución de la respuesta al tratamiento a lo largo del tiempo.

El IFN β -1b (*Betaferon®* y *Extavia®*) se administra por vía subcutánea y fue el primero de los agentes inmunomoduladores de efectividad probada en el manejo de la EM a largo plazo. Actualmente existen tres formas de presentación para el IFN β -1a que se administran por vía subcutánea (*Rebif®*) o intramuscular (*Avonex®* y *Plegridy®*) y que

presentan la ventaja respecto al IFN β -1b de que tienen menos capacidad inmunogénica para producir NABs.

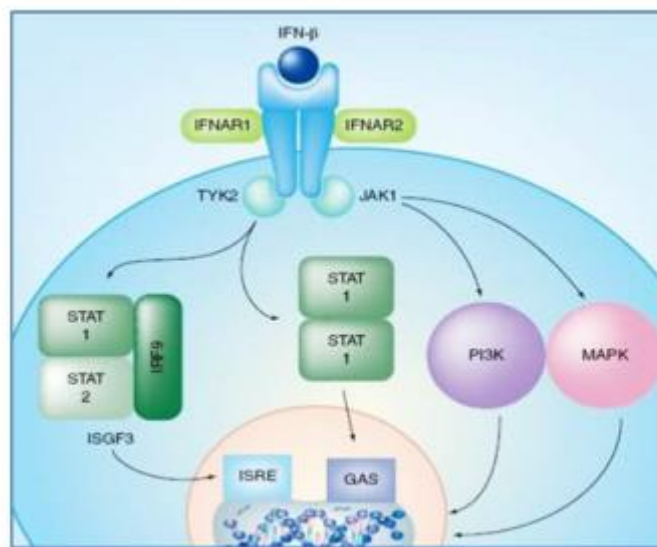


Fig 6. Rutas de señalización de INF- β . El IFN- β se une a su receptor y activa la ruta de señalización JAK-STAT provocando la formación de complejos ISGF3 que migran al núcleo donde se unen a ISREs, localizados en el promotor de genes, activando la transcripción. STAT puede unirse a otro elemento situado en la región promotora de los genes GAS. Otras vías de señalización que pueden ser activadas por IFN- β son MAPK y PI3K. GAS: sitio de activación de INF. ISRE: elemento de estimulación de respuesta por INF.

- ACETATO DE GLATIRÁMERO

El acetato de glatirámico imita la estructura de la proteína básica de mielina (MBP) mediante una mezcla de polipéptidos de longitudes variables (entre 40 y 100 aminoácidos) formados por la combinación aleatoria de ácido L-glutámico, L-alanina, L-tirosina y L-lisina²⁴.

Su mecanismo de acción no se conoce por completo, pero se cree que puede actuar a dos niveles fundamentalmente. Por un lado, se piensa que puede cambiar el patrón de una respuesta inmunológica de tipo proinflamatorio inducida inicialmente, a una respuesta de tipo antiinflamatorio. Esto es debido a que se ha visto que la exposición de las células T al AG produce una disminución de los linfocitos Th1 proinflamatorios, al mismo tiempo que induce una expansión de los linfocitos Th2 antiinflamatorios y sus

citoquinas (IL-4, IL-6, IL-10) a nivel periférico²⁷. Estas células antiinflamatorias Th2 periféricas-reactivas frente al AG migrarían al SNC donde, mediante reactividad cruzada pueden reaccionar con la MBP generando una respuesta protectora antiinflamatoria por un mecanismo denominado “bystander suppression”²⁸⁻³⁰ (Figura 7). Por otro lado, el segundo mecanismo de acción propuesto para el AG, es que también podría actuar como inhibidor competitivo de la MBP en su unión al complejo HLA actuando como antagonista de las células T reactivas a la MBP induciendo una respuesta no activadora y por tanto, dejándolas inactivas o en apoptosis^{31,32}.

El acetato de glatirámero (*Copaxone®*) se administra por vía subcutánea en una dosis fija de 20 mg al día. Tras la administración, se degrada rápidamente dando lugar a pequeños oligopéptidos y aminoácidos libres, de manera que la concentración sérica del fármaco es muy baja o indetectable. Los anticuerpos inducidos por el tratamiento con AG no son neutralizantes y por tanto, no afectan a la eficacia clínica del fármaco a largo plazo.

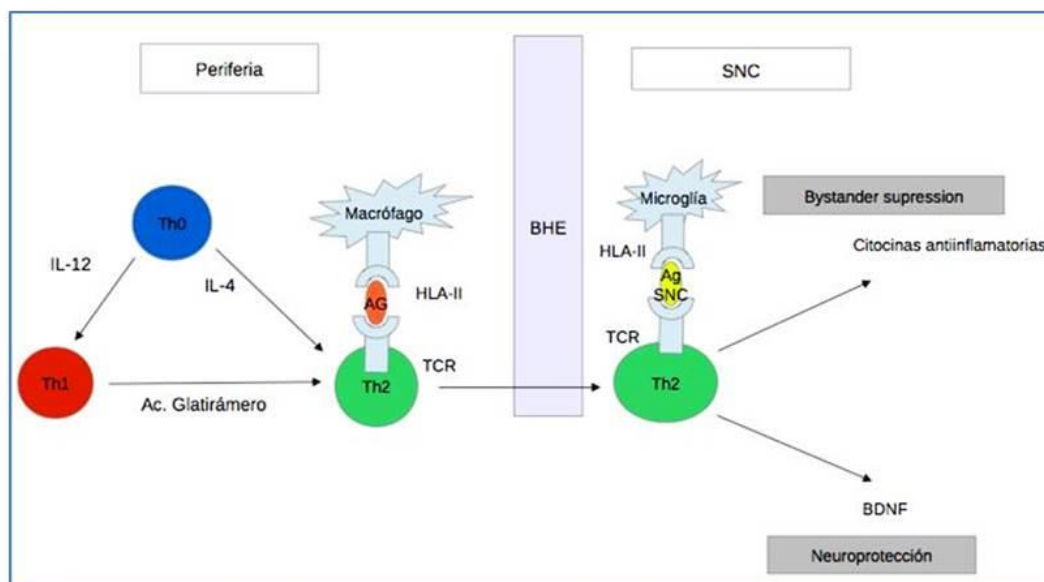


Fig 7. Mecanismo de acción del acetato de glatirámico.

4.2. Tratamientos de segunda y tercera línea

Durante los últimos años, se han aprobado una serie de nuevos fármacos con gran potencia terapéutica que se utilizan solo como tratamientos de segunda (natalizumab, fingolimod, mitoxantrona) o tercera línea (alemtuzumab, daclizumab) en pacientes no respondedores a los tratamientos menos agresivos o en pacientes con un curso más grave de la enfermedad, ya que, aunque presentan mayor eficacia a la hora de frenar la progresión y disminuir el número de brotes, también desencadenan efectos secundarios más complejos.

En el caso de natalizumab está claramente descrito el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) asociado a su uso en pacientes con serología positiva para el virus JC^{37,38}. El tratamiento con mitoxantrona (análogo de la antraciclina) lleva asociado el riesgo de sufrir disfunción sistólica (12%) y de desarrollar leucemia (0.8%)^{39,40}. En cuanto al fingolimod es un novedoso inmunosupresor selectivo que actúa sobre los receptores de esfingosina-1 fosfato, pero su administración produce bradicardia, que debe ser monitorizada sobre todo en los primeros meses de tratamiento y puede producir alteraciones graves del ritmo cardiaco en pacientes con enfermedades coronarias preexistentes. Respecto a los tratamientos de tercera línea, el alemtuzumab⁴¹⁻⁴³ fue aprobado por la EMA en 2013 y se administra a pacientes en los que, a pesar de someterse a tratamientos de segunda línea como natalizumab o fingolimod, siguen teniendo la enfermedad activa, siendo los efectos secundarios adversos más frecuentes, náuseas, urticaria y disminución de leucocitos y linfocitos en sangre periférica. La FDA también aprobó en 2016 el daclizumab⁴³ como fármaco alternativo sólo para pacientes que fallan en la respuesta al tratamiento con fármacos de primera y segunda línea, ya que puede producir daño hepático grave y/o reacciones de hipersensibilidad incluyendo anafilaxis o angioedema.

- NATALIZUMAB

El uso de natalizumab (*Tysabri*®) está restringido a pacientes refractarios al tratamiento con IFN- β o AG y a pacientes con EM recidivante grave de evolución rápida. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG4) antagonista de las moléculas de adhesión expresadas en la superficie de los linfocitos T autorreactivos (integrina VLA4). La unión de natalizumab a la integrina VLA-4 impide su interacción con las moléculas de adhesión celular de los vasos sanguíneos (VCAM-1) que están sobreexpresadas en el endotelio durante la inflamación. De esta forma, se bloquea el paso de los linfocitos T autorreactivos a través de la BHE, inhibiendo así su acceso a las placas de desmielinización y frenando su acción inflamatoria sobre esta región⁴⁴ (Figura 8).

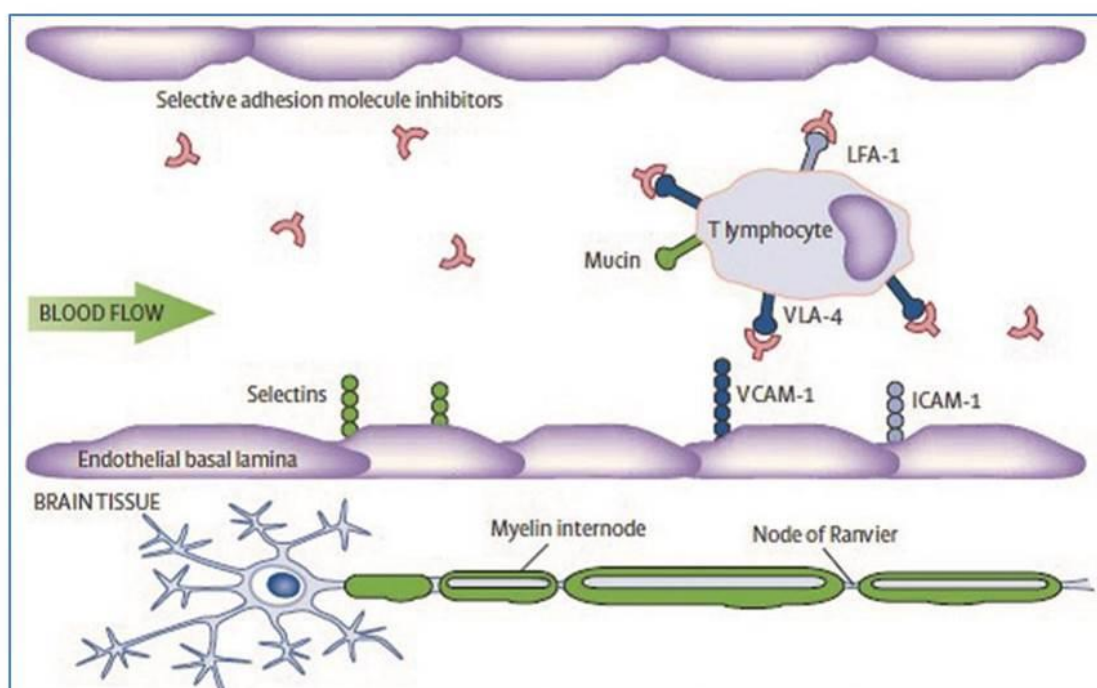


Fig 8. Inhibición del tráfico de linfocitos por el tratamiento con natalizumab (imagen extraída de Carson y col.⁴⁵)

Principio activo	Nombre comercial	Laboratorio titular	Año de aprobación	Modo de administración	Frecuencia de administración
Acetato de glatirámico	<i>Copaxone®</i> 20 o 40	Teva Pharmaceuticals Ltd.	2002	Subcutáneo	Cada día o 3 veces por semana
Alemtuzumab	<i>Lemtrada®</i>	Genzyme Therapeutics Ltd.	2013	Intravenoso	Ciclos de 5 ó 3 días anuales
Dimetilfumarato	<i>Tecfidera®</i>	Biogen	2014	Oral	Dos veces/día
IFN β-1a	<i>Avonex®</i>	Biogen	1998	Intramuscular	Una vez/semana
IFN β-1a	<i>Rebif®</i>	Merck Serono Europe Ltd.	1995	Subcutáneo	3 veces/semana
IFN β-1b	<i>Betaferon®</i>	Bayer Pharma Ag	2008	Subcutáneo	Cada dos días
IFN β-1b	<i>Extavia®</i>	Novartis Europharm Ltd	2014	Subcutáneo	Cada dos días
IFN β-1a pegilado	<i>Plegridy®</i>	Biogen	2011	Subcutáneo	Cada dos semanas
Fingolimod	<i>Gilenaya®</i>	Novartis Europharm Ltd.	2011	Oral	Cada día
Mitoxantrona	<i>Novantrone®</i>	Media Pharma S.A.U.	1998	Intravenoso	Dosis máx. acumulada: 140 mg/m ²
Natalizumab	<i>Tysabri®</i>	Biogen	2006	Intravenoso	Cada 4 semanas
Teriflunomida	<i>Aubagio®</i>	Sanofi-Aventis Groupe	2013	Oral	Una vez/día

Tabla 1. Tratamientos modificadores de la esclerosis múltiple aprobados por la EMA (*European Medicines Agency*)

5. Epidemiología

En Europa y Norteamérica la EM es una de las enfermedades neurológicas más frecuentes en adultos jóvenes, constituyendo una de las principales causas de discapacidad en esta población.

Aunque puede comenzar a cualquier edad, es raro que aparezca antes de los 15 y después de los 60 años y se ha observado que existe un pico de incidencia entre los 25-30 años y otro en torno a los 40 años.

Suele afectar con mayor frecuencia a mujeres que a hombres, generalmente en una proporción 2:1. Sin embargo, este ratio se modifica en zonas de alto riesgo, donde la prevalencia en mujeres puede llegar a aumentar hasta 3:1. También se ha visto un cambio de esta proporción en función de la forma clínica, ya que en formas primarias progresivas la prevalencia se iguala entre hombres y mujeres⁴⁶.

Los primeros estudios epidemiológicos realizados por Kurtzke^{47,48}, mostraron que existía una distribución irregular de la enfermedad a lo largo de todo el mundo, describiéndose tres zonas con diferentes riesgos en relación a la localización geográfica. Kurtzke describió una zona de riesgo alto en el norte de Europa y de EE.UU. y Canadá (más de 30 casos/100.000 habitantes), una zona de riesgo medio en Australia y en el sur de Europa y de EE.UU. (entre 5 y 30 casos/100.000 habitantes) y otra zona de riesgo bajo en África, América central y Sudamérica (menos de 5 casos/100.000 habitantes).

Sin embargo, esta distribución geográfica de la enfermedad se ha visto modificada a lo largo del tiempo como muestran los últimos estudios realizados, en los que se ha observado un claro aumento de las tasas de incidencia y prevalencia durante los últimos 20-30 años⁴⁹⁻⁵⁵ (*Figura 9*).

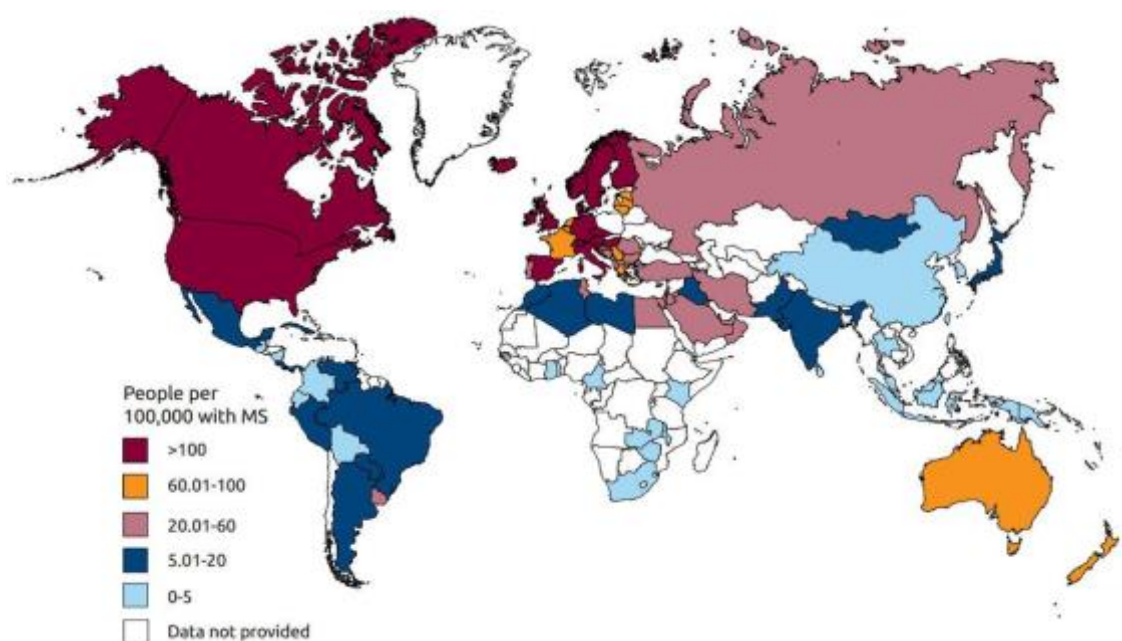


Fig 9. Prevalencia mundial de la EM (2013). Figura extraída del Atlas de Esclerosis Múltiple del 2013⁶⁰

Al existir una distribución geográfica de la enfermedad, se ha pensado que la latitud podría jugar un papel determinante a la hora de predecir la prevalencia de la EM, ya que su incidencia aumenta a medida que aumenta la latitud en ambos hemisferios y de hecho, se ha demostrado que existe un gradiente latitudinal Norte-Sur entre países y continentes a escala mundial. Sin embargo, existen llamativas excepciones que modifican la prevalencia que predice la latitud:

- Diferencias raciales: dentro de una misma zona, los negros y asiáticos tienen menos riesgo de padecer la enfermedad frente a los blancos.
- Migraciones: las migraciones en edades tempranas entre zonas de alto y bajo riesgo reflejan cambios en la prevalencia de la enfermedad, observándose una tendencia a adquirir el riesgo de la zona a la que se produce la migración (*Figura 10*).

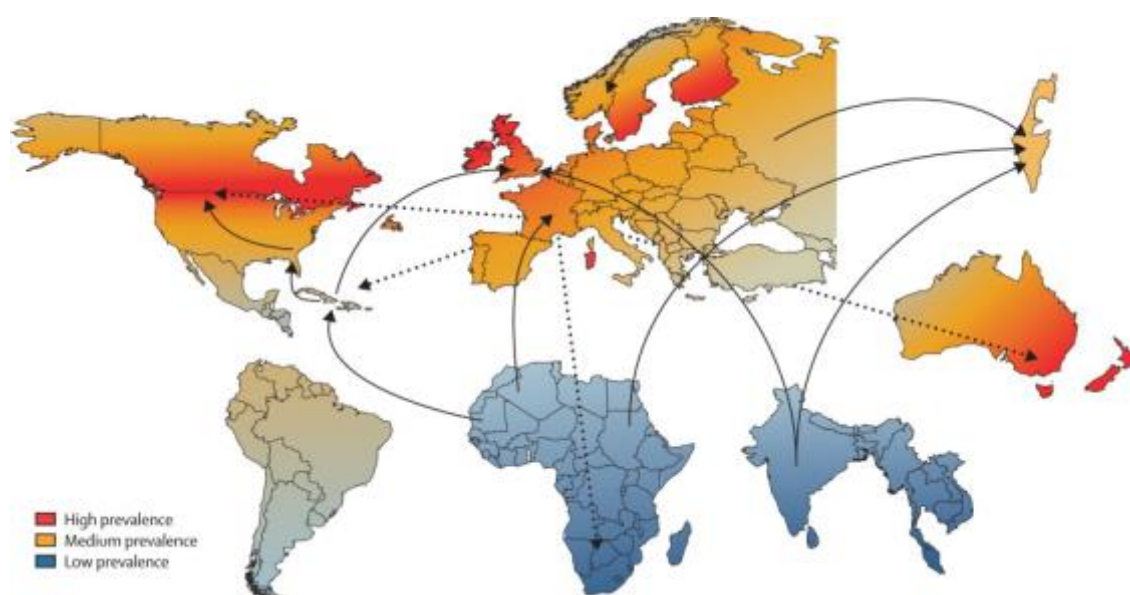


Fig 10. Geografía de la EM y migraciones. Las principales rutas de migración desde las zonas de alto riesgo del norte de Europa se muestran como líneas de puntos. Los estudios que implican migraciones desde zona de bajo riesgo a las zonas de alto riesgo se muestran como líneas completas.

Estas excepciones junto con los aumentos de las tasas de incidencia y prevalencia en ciertas regiones (Sicilia y Cerdeña)⁵⁶⁻⁵⁹ o las cifras anormalmente bajas en otras zonas (regiones nórdicas de los países escandinavos), han descartado la teoría del gradiente latitudinal como el único factor a tener en cuenta a la hora de explicar el patrón demográfico observado a escala mundial.

Por último, cabe destacar que en los últimos años se ha observado un sorprendente cambio en la distribución de la enfermedad que ha sido demostrado por los estudios epidemiológicos realizados recientemente. Estos estudios apuntan fundamentalmente a dos motivos como responsables de esta variación en la incidencia de la EM. Por un lado, se ha observado un incremento de la prevalencia directamente relacionado con un aumento de la supervivencia. Y por otro, se ha visto un claro aumento de la incidencia en numerosos lugares, que afecta fundamentalmente a las mujeres y que podría estar relacionado con un cambio de los hábitos de vida que incluirían factores de riesgo relacionados con la etiología de la enfermedad (exposición al sol, tabaco...).

6. Etiología

La EM se caracteriza por ser una enfermedad etiológicamente compleja, ya que a pesar de ser una entidad clínica bien descrita desde hace más de un siglo, todavía se desconoce el factor desencadenante responsable de su desarrollo (*Figura 11*).

Actualmente, la hipótesis patogénica más aceptada sugiere que la EM se desencadena en sujetos genéticamente predispuestos sobre los que incide un factor ambiental⁶¹, que actuaría en las primeras etapas de la vida (antes de la adolescencia) y que a lo largo del tiempo, pondría en marcha un proceso inmune anormal en el SNC produciendo la inflamación de la mielina y la degeneración axonal-neural que acabaría desembocando en la aparición de las lesiones características de la enfermedad (placas).

Los estudios epidemiológicos clásicos sugieren un factor ambiental como el causante de la enfermedad debido fundamentalmente a varias evidencias observadas como por ejemplo, el gradiente geográfico de prevalencia, los agrupamientos de casos o posibles epidemias, los cambios de frecuencia debidos a las migraciones, la falta de concordancia al 100% en gemelos monocigóticos y el cambio objetivado en la frecuencia de aparición de la enfermedad en determinadas áreas. Sin embargo, una etiología debida exclusivamente a un factor ambiental, no explicaría las diferencias raciales que existen a la hora de desarrollar la EM o la aparición de grupos étnicos resistentes a padecer la enfermedad a pesar de las migraciones. Estas evidencias sugieren que además de factores ambientales, parece imprescindible la existencia de factores genéticos de susceptibilidad para que se llegue a desencadenar la EM, teoría apoyada por multitud de estudios que demuestran la existencia de agregación familiar y la asociación con determinados haplotipos de HLA.

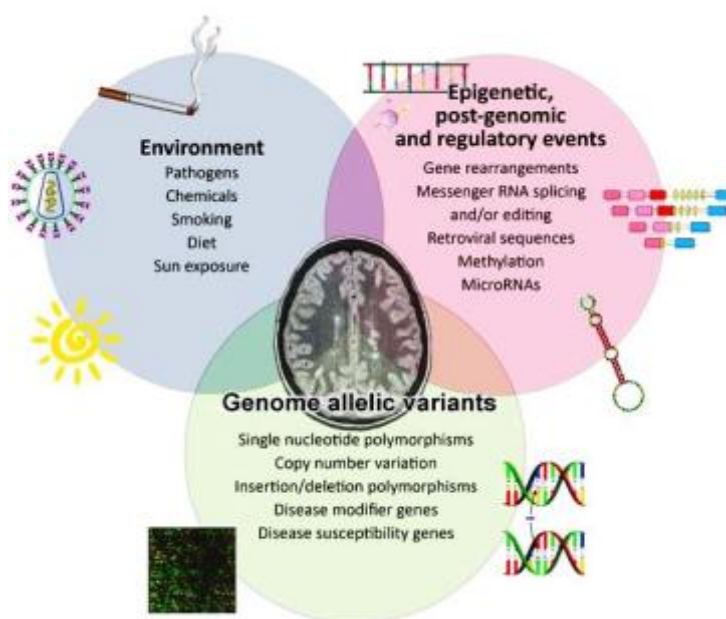


Fig 11. Posibles factores implicados en el desarrollo de la EM.

En la actualidad, está ampliamente aceptado que la etiología de la EM tiene un componente ambiental y un componente genético de susceptibilidad. Sin embargo, determinar un factor ambiental concreto y/o genes específicos está resultando muy complicado, ya que los estudios sugieren que la interacción ambiente-gen en la EM es extremadamente compleja. De hecho, se ha visto que la epigenética (ciencia que estudia las modificaciones en la expresión de un mismo gen debidas a factores ambientales que provocan respuestas distintas en la misma secuencia génica), podría jugar un papel muy importante tanto como causa del inicio de la enfermedad como en su forma clínica de presentación (formas recurrentes, progresivas, más o menos agresivas...). En este sentido, en los últimos años se ha visto en numerosos estudios, que factores ambientales como la vitamina D o el hábito tabáquico, que están asociados al inicio y/o progresión de la enfermedad, podrían estar llevando a cabo su acción a través de mecanismos epigenéticos⁶².

Además, se ha visto que la complejidad etiológica de la EM es aún mayor, ya que en los últimos estudios realizados, se ha demostrado un efecto sinérgico en cuanto al

riesgo de padecer EM cuando interactúan en el mismo paciente varios factores de riesgo a la vez: por ejemplo, la hipovitaminosis D y el hábito tabáquico multiplican el riesgo de desarrollar EM en aquellas personas susceptibles genéticamente de desarrollar la enfermedad que además han sufrido mononucleosis infecciosa, respecto a los que no la han padecido⁶³.

6.1. Etiología genética

La EM no es hereditaria, sino una enfermedad con predisposición genética. Se asume un modelo de herencia poligénico, en el que en función del conjunto de polimorfismos heredados en distintos genes, hacen al sujeto más o menos susceptible de desarrollar la enfermedad tras la exposición a uno o varios factores ambientales. A nivel molecular, los estudios genéticos llevados a cabo en familias afectadas, han mostrado que los genes presentes en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) son los que fundamentalmente están asociados al riesgo de padecer la enfermedad. Fuera de esta región, se han encontrado otros genes de susceptibilidad, pero se ha visto que su contribución al riesgo total es relativamente baja.

El MHC es una región génica de 3.6 Mb (*Figura 12*) que se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (locus 6p21.3). Está constituida por tres subregiones según su localización, siendo la más centromérica la región de clase II (DR, DQ, DP) y la más telomérica la región de clase I (A, B, C). El MHC se caracteriza por su alta densidad génica (421 genes), su baja tasa de recombinación (lo que conlleva un elevado desequilibrio de ligamiento entre sus segmentos) y un gran número de polimorfismos, (lo que le convierten en una región génica de alta variabilidad genética).

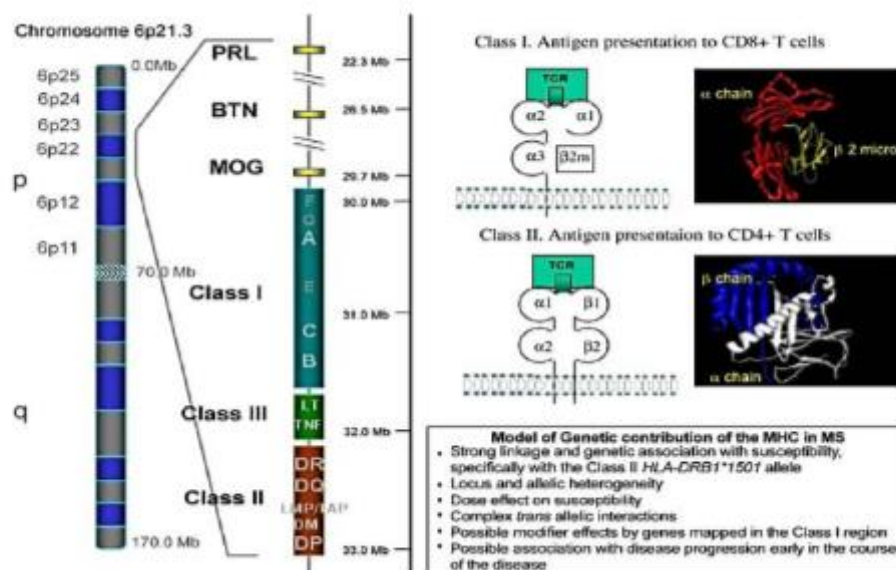


Fig 12. La región cromosómica 6p21.3. La subregión de clase I y la de clase II codifican para glicoproteínas de superficie celular altamente polimórficas que intervienen en la presentación de antígenos a los LTs. La región del HLA de clase III contiene muchos genes que codifican proteínas que no están relacionadas con la inmunidad celular, pero que modulan o regulan la respuesta inmune de otras formas. Figura extraída de Hauser *et al.*⁷⁰.

La asociación del HLA con la EM, empezó a conocerse a partir de la década de los 70 y podría explicar alrededor del 20% de la susceptibilidad⁶⁴, siendo el alelo HLA-DR2 del gen HLA-DRB1 el que primero se asoció con la enfermedad. Durante los últimos años, los estudios de asociación mediante barrido genómico (GWAS, *genome wide association studies*) que analizan simultáneamente todo el genoma en busca de loci asociados a la enfermedad, han permitido refinar y ampliar esta asociación. Actualmente, están claramente definidos una serie de haplotipos del complejo HLA relacionados con el riesgo de desarrollar EM^{65,66}:

- HLA-DRB1*15:01; cada copia de este gen aumenta tres veces el riesgo de padecer EM, siendo este alelo el que se ha asociado más fuertemente con la enfermedad hasta la fecha.
- HLA-DRB1*13:03 y HLA-A*02:01; parece ser que la presencia de estos alelos confieren al sujeto portador un efecto protector.

Además, en la actualidad, se han descrito otros alelos: HLA-DRB1*03:01; HLA-DRB1*08:01 (alelos de riesgo) y HLA-A*68:01, *02:05 y *02:06 (alelos protectores), aunque su asociación con la enfermedad aún no está completamente confirmada.

En cuanto a los genes situados fuera del sistema HLA, actualmente existen 103 variantes de tipo polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) que se asocian con un incremento del riesgo moderado (solo aumentan el riesgo entre 1.08 y 1.22 veces)^{67,68}, pero que junto con el HLA explicarían el 25% de la carga genética de la EM⁶⁹. Estos SNPs se localizan fundamentalmente en genes responsables de la regulación de la respuesta inmune (hasta un 80% de los genes) y genes relacionados con factores ambientales asociados a la EM (por ejemplo, genes del metabolismo de la vitamina D). Algunos de los SNPs (más del 30%) se han relacionado a su vez con el riesgo de padecer otras enfermedades autoinmunes, lo que pone de manifiesto la gran importancia de la dis inmunidad en el desarrollo de la EM.

En cuanto a la herencia de estos polimorfismos de susceptibilidad, cuando se han llevado a cabo estudios de agregación familiar, se ha visto que entre un 15-20% de enfermos de EM, tienen un familiar afecto por la enfermedad, encontrándose el mayor riesgo entre hermanos (2-5%) y disminuyendo (1% en pacientes de segundo grado) con el alejamiento de parentesco. En el caso de gemelos monocigóticos, se estima que el riesgo es del 30% en Europa y Norteamérica, reduciéndose a la mitad en áreas geográficas del sur. Además, se ha observado que el riesgo de padecer EM, se hereda de los dos padres, ya que en los casos en los que ambos progenitores tienen EM, sus hijos tienen un riesgo mayor que en aquellos que tienen exclusivamente uno. También se ha observado en múltiples estudios que existe susceptibilidad racial a padecer la enfermedad, ya que afecta mayoritariamente a las personas de raza blanca de origen caucásico. En contraposición, existen determinados grupos étnicos

(esquimales, lapones, gitanos, aborígenes australianos) que muestran un riesgo muy bajo de presentar la enfermedad a pesar de vivir en áreas de alta incidencia.

6.2. Etiología ambiental

Los estudios de migración, los gradientes geográficos, así como el alto grado de discordancia en gemelos monocigóticos han llevado a pensar en un origen ambiental de la EM desde que se conoce esta enfermedad.

Se han realizado numerosos estudios epidemiológicos observacionales en los que se ha encontrado asociación de la EM con multitud de factores ambientales. Sin embargo, está resultando complicado establecer un papel causal de alguno o varios de estos factores, debido a que el tiempo que transcurre entre el inicio real de la enfermedad (respuesta autoinmune que provoca la desmielinización), su manifestación clínica y el momento de su diagnóstico puede ser muy prolongado.

Lo que sí parece claro, es que según han demostrado los estudios migratorios, la exposición a los factores ambientales causantes de la enfermedad, debe realizarse durante la infancia o la adolescencia temprana, ya que sólo se adquiere el riesgo de la zona a la que se emigra cuando la migración se realiza antes de los 15 años⁷¹⁻⁷³.

Existen múltiples factores ambientales que se han postulado como posibles desencadenantes o facilitadores de la enfermedad (exposición solar, vitamina D, hábitos dietéticos, hábitos tabáquicos, exposición a tóxicos...)⁷⁷⁻⁸⁴, pero desde hace años el factor ambiental que mayoritariamente se ha propuesto como posible causa de la EM es la infección por un virus. Existen multitud de estudios que muestran una asociación entre la presencia de infecciones virales y la progresión de la EM, aunque aún no se ha identificado un virus concreto como el causante de la enfermedad, a pesar de que se han propuesto numerosos candidatos (*Tabla 2*).

Familia	Virus
<i>Herpesviridae</i>	Herpes simples virus (HSV) Varicella zoster virus (VZV) Epstein-Barr virus (EBV) Herpesvirus Humano 6 (HHV-6) Virus de la enfermedad de Marek (MDV)
<i>Retroviridae</i>	Human T-cell leukemia virus tipo 1 (HTLV-1) Retrovirus endógenos humanos (HERV-K, HERV-H, HERV-W)
<i>Paramyxoviridae</i>	Sarampión Paperas Virus de la Parainfluenza tipo 1 Virus del moquillo canino Virus de los simios tipo 5
<i>Coronaviridae</i>	Corona virus
<i>Papovaviridae</i>	JC virus
<i>Bornaviridae</i>	Virus de la enfermedad de Borna

Tabla 2. Algunos virus asociados con la EM.

Desde los primeros trabajos en los años ochenta y noventa que apuntaban a una infección vírica como desencadenante de la enfermedad, se han investigado múltiples virus aplicando técnicas muy distintas para abordar su estudio, dando lugar a una considerable cantidad de resultados, que han resultado en muchos casos incluso contradictorios. Sin embargo, de manera más o menos general existen tres virus sobre los que se han acumulado un importante conjunto de evidencias para proponerlos como los candidatos más plausibles implicados en la patogenia de la EM. Se trata de los retrovirus endógenos humanos (HERVs) y dos miembros de la familia *Herpesviridae*: el virus del Epstein-Barr (VEB) y el herpesvirus humano 6 (HHV-6A/B)⁷⁴⁻⁷⁶.

RETROVIRUS ENDÓGENOS HUMANOS (HERVs)

Se considera que los HERVs entraron en la línea germinal en nuestro genoma hace millones de años a través de la infección de retrovirus exógenos, perpetuándose a través de sucesivas generaciones mediante herencia mendeliana. Pueden llegar a constituir el 8% del genoma humano y se ha visto que algunas copias tienen capacidad codificante.

El retrovirus más estudiado en relación a la EM es el MSRv (*Multiple Sclerosis associated Retrovirus*) dentro de la familia HERV-W y su proteína de cubierta *env*. Se ha asociado a la EM tanto a nivel de susceptibilidad de padecer la enfermedad como a nivel de manifestar un curso más agresivo y con un peor pronóstico de su evolución⁸⁵. De hecho, se han encontrado retrovirus en muestras de sangre, LCR y biopsias de pacientes con EM con mayor número de recaídas y con formas clínicas de curso progresivo^{86,87}.

HERPESVIRUS HUMANOS

La familia de Herpesvirus está compuesta por 8 tipos de agentes, clasificados en tres familias (alfa, beta y gamma). Todos los Herpesvirus tienen tres elementos estructurales básicos (*Figura 13*):

- Nucleocápside simétrica de estructura icosaédrica con un diámetro de 90 a 100 nm que contiene el ADN viral
- Envuelta con glicoproteínas
- Tegumento viral que se encuentra entre la nucleocápside y la envuelta y que está formado por una mezcla de proteínas.

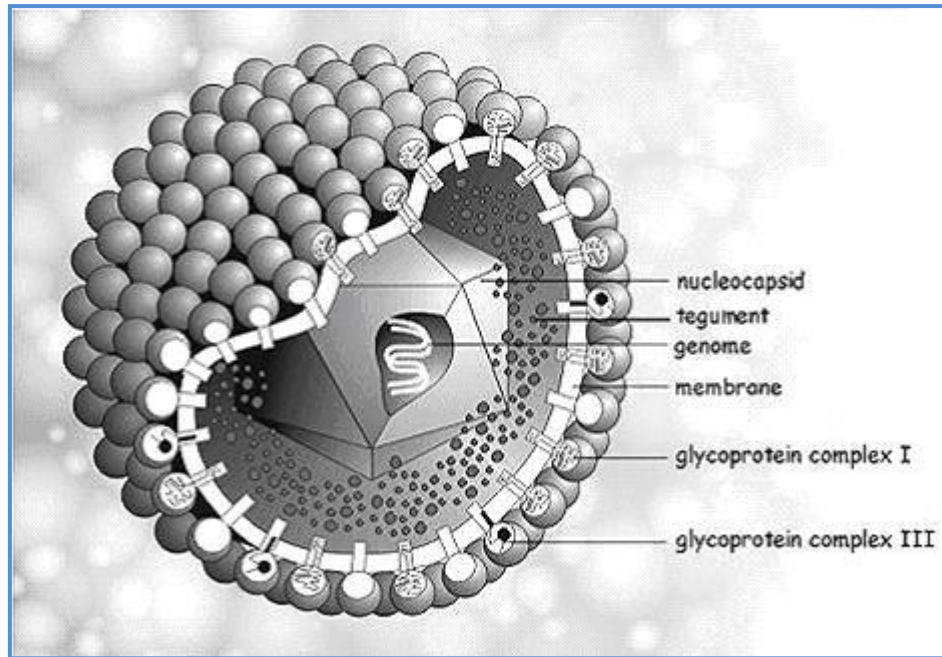


Fig 13. Estructura de un virus de la familia *Herpesviridae*

El principal motivo por el que los Herpesvirus humanos se han implicado habitualmente en la patogenia de la EM, es porque tras una infección primaria que suele producirse durante la infancia o la adolescencia, quedan latentes en el huésped pudiendo reactivarse periódicamente a lo largo del tiempo, lo que se puede relacionar con el curso clásico en brotes de la EM. Los estados de latencia y reactivación ocurren en sitios distintos del cuerpo del huésped. Así, las células mononucleares circulantes y la médula espinal son zonas de latencia, mientras que el tejido cerebral y las glándulas salivares son considerados sitios de replicación crónica. Otra de las características de los Herpesvirus que apoyan su implicación en la EM es que en muchas ocasiones pueden establecer su nicho en el SNC donde causan infecciones persistentes y donde pueden incluso llegar a producir desmielinización^{88,89}.

VIRUS DE EPSTEIN BARR (VEB)

Es el virus más estudiado en relación a la EM. En todos los trabajos realizados hasta la fecha, se ha encontrado una fuerte asociación del VEB con esta enfermedad, sin embargo, aún no se ha conseguido esclarecer si esta asociación es causativa o el VEB es sólo un desencadenante no específico de la cascada autoinmune.

Entre las evidencias que relacionan al VEB con la EM, encontramos que prácticamente todos los pacientes presentan anticuerpos frente a este virus encontrándose una seroprevalencia entre el 80-99%⁹⁰⁻⁹⁴ (en la población general encontramos valores del 80-95%).

También parece ser que el momento en el que se produce la infección y la respuesta inmunológica del paciente juega un papel muy importante a la hora de desarrollar la enfermedad. Así, el riesgo de padecer EM aumenta entre 2-3 veces en sujetos infectados por VEB en la adolescencia cuando la infección se manifiesta clínicamente como mononucleosis infecciosa, respecto a los adolescentes en los que la infección es silente y cursa sin ningún tipo de sintomatología⁹³.

Por último, otra evidencia que apoya el papel del VEB en la etiopatogenia de la EM es que existen estudios en los que se ha demostrado la replicación activa del virus durante los brotes⁹⁵.

HERPESVIRUS HUMANO 6 (HHV-6)

El HHV-6 se ha asociado repetidamente con la patogénesis de la EM. Se trata de un betaherpesvirus constituido por una cadena lineal de ADN de doble hélice de 160 kb. Es un virus ubicuo con una seroprevalencia mayor al 95% en la población general¹⁰¹ y que presenta tropismo por las células del SNC y del SI¹⁰².

Inicialmente se describieron dos variantes que actualmente son consideradas como dos virus independientes¹⁰⁵:

- **HHV-6A:** es el que más frecuentemente se ha asociado con la EM debido a su mayor capacidad neurotrópica. Sin embargo, la falta de ensayos serológicos adecuados para su detección implica que se conozca menos acerca de su infección y seroprevalencia que del otro virus.
- **HHV-6B:** su infección primaria se da en niños menores de dos años pudiendo cursar de manera asintomática o produciendo exantema súbito de la infancia (roséola infantil), una enfermedad pediátrica benigna en la que se produce fiebre y rash cutáneo^{96,97}.

En ambos casos, después de la infección primaria, el virus pasa a una etapa de latencia en células mononucleares circulantes de sangre periférica. En población sana, suele permanecer en estado latente, pero en individuos inmunocomprometidos, puede presentar reactivaciones periódicas a lo largo de la vida, desencadenándose una respuesta inmunológica que puede llegar a tener consecuencias graves (*Figura 14*).

Desde los primeros artículos que relacionaban el HHV-6 con la EM aparecidos en 1993¹⁰⁴, se han publicado muchos otros estudios presentando resultados contradictorios acerca del posible papel del virus en la enfermedad, en los que mientras algunos autores defienden su asociación, otros la niegan. En cualquier caso, parece que el neurotropismo del virus, así como el hecho de que su infección primaria puede llevar a complicaciones neurológicas graves, juegan a favor de que el HHV-6 se pueda considerar un candidato a tener en cuenta en la etiopatogenia de la EM.

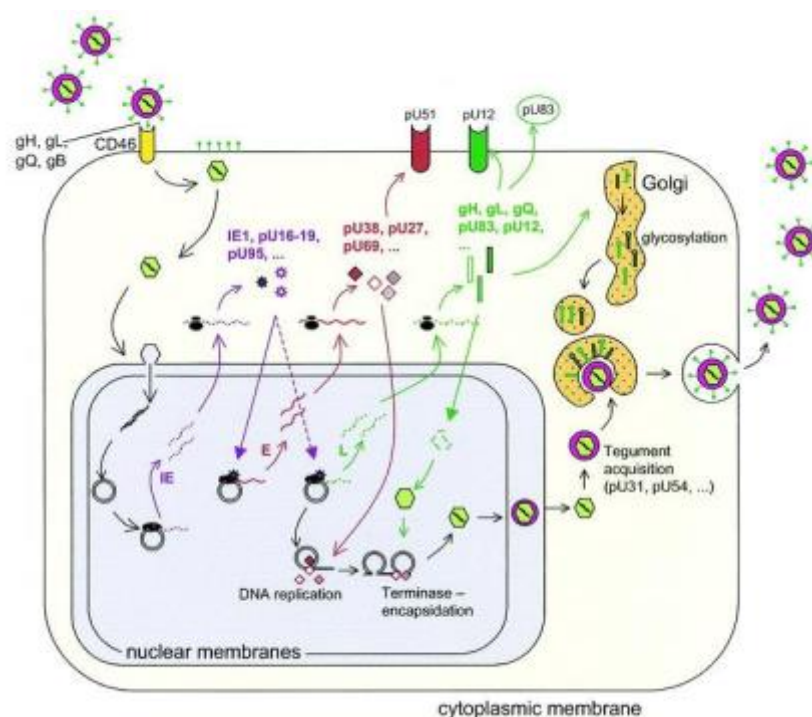


Figura 14. Esquema del ciclo replicativo del HHV-6

Se han propuesto muchas hipótesis para explicar como el HHV-6 puede actuar como agente causal en la EM, incluyendo una acción citopática directa, modulación de la producción de citoquinas durante la infección aguda o un incremento de la respuesta inmune durante la reactivación viral.

Existen estudios que han demostrado que el HHV-6 es capaz de infectar células dendríticas inmaduras produciendo en ellas alteraciones fenotípicas y funcionales, asociándose además la infección del virus a la muerte de oligodendrocitos¹⁰⁶.

También se ha descrito un posible efecto desmielinizante del HHV-6 por reacción cruzada con la mielina, ya que se ha encontrado que existe un mimetismo molecular (misma secuencia de aminoácidos) entre los aminoácidos 96-102 de la MBP y los aminoácidos 4-10 de la proteína U24 del virus^{98,99}. Parece ser que la MBP contiene una Treonina (Thr) en posición 97, cuya fosforilación afecta a su correcto funcionamiento. La proteína U24 presenta una Thr equivalente en posición 5 que

también es susceptible de ser fosforilada compitiendo con la fosforilación de la MBP alterando por tanto sus acciones normales y desencadenando el proceso patológico¹⁰⁰. A nivel molecular, el ADN del HHV-6 se ha encontrado en placas de desmielinización, en LCR, en oligodendrocitos, en linfocitos y en microglía de tejidos lesionados de pacientes con EM en niveles más altos que en sujetos sanos. También se ha demostrado replicación viral activa mediante la detección del ARN^{103,104}.

Sin embargo, a pesar de la multitud de estudios que relacionan el HHV-6 con la EM, aún no se ha conseguido establecer un papel causal con la enfermedad, debido en parte a la alta prevalencia del virus latente en población sana.

HIPOTESIS

El HHV-6 se ha propuesto desde hace años como agente infeccioso relacionado con la EM. Numerosos estudios han documentado su capacidad neurotrópica sugiriendo que la infección viral puede jugar un papel importante en la desmielinización. Además, se han encontrado niveles más altos de este virus en el SNC, en PBMCs, en el LCR y en el suero de los pacientes con EM respecto a los sujetos sanos.

La serología del HHV6A/B constituye un reflejo de la respuesta inmune frente al virus, por lo que su implicación en la EM podría relacionarse con los niveles de anticuerpos frente a este virus. Además, como los distintos tratamientos para la EM actúan sobre el sistema inmune, podría existir una correlación entre los niveles de los títulos de anticuerpos frente al HHV-6A/B, la respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad.

OBJETIVOS



1. Estudiar la variación de los títulos de anticuerpos del virus HHV-6A/B en relación a la progresión de la EM durante dos años de seguimiento en pacientes diagnosticados de esta enfermedad sometidos a distintos tipos de tratamientos: INF- β , AG y NTZ.
2. Estudiar la variación de los títulos de anticuerpos del virus HHV-6A/B en relación a la tasa anualizada de brotes durante dos años de seguimiento en pacientes diagnosticados de EM sometidos a distintos tipos de tratamientos: INF- β , AG y NTZ.
3. Estudiar la relación entre la serología del virus HHV-6A/B y la repuesta clínica a distintos tratamientos para EM: INF- β , AG y NTZ.
4. Estudiar una posible predisposición genética al desarrollo de anticuerpos (IgG e IgM) frente al HHV-6A/B en relación al haplotipo HLA.
5. Estudiar una posible predisposición genética al desarrollo de anticuerpos (IgG e IgM) frente al HHV-6A/B en relación a SNPs situados en genes relacionados con EM descritos en los estudios de asociación del genoma completo GWAS¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Población de estudio

Se ha llevado a cabo un estudio prospectivo de diseño longitudinal de seguimiento a 2 años sobre una población de 301 pacientes diagnosticados de EM sometidos a tres tipos de tratamientos: INF- β , AG y NTZ (*Tabla 3*).

Los pacientes seleccionados (196 mujeres; 65% y 105 hombres; 35%) se diagnosticaron de EM de acuerdo a los criterios de McDonald del 2010¹⁷. La edad media de la población estudiada fue de 41 años y la edad media de comienzo de la enfermedad fue de 31 años.

EM-RR	EM-PS	EM-PP
94%	5%	1%
282/301	16/301	3/301

Tabla 3. Distribución de la población objeto de estudio en función del diagnóstico de EM.

Independientemente del tipo de EM, los pacientes se dividieron en tres grupos según el tratamiento al que iban a ser sometidos (*Tabla 4*).

INF β			AG	NTZ
<i>Betaferon®</i>	<i>Rebif®</i>	<i>Avonex®</i>	<i>Copaxone®</i>	<i>Tysabri®</i>
24.2%	12%	4.3%	29.6%	26.9%
82/301	36/301	13/301	89/301	81/301

Tabla 4. Distribución de la población objeto de estudio en función del tratamiento.

También se incluyeron en el estudio 337 controles sanos, de los que 192 fueron mujeres (57%) y 145 fueron hombres (43%) con una edad media de 37 años.

2. Muestras

La determinación de los anticuerpos anti-HHV-6A/B (de clase IgG e IgM) se realizó en suero. Se extrajeron muestras de cada paciente antes de comenzar el tratamiento y a partir de ese momento, cada 6 meses a lo largo de los dos años de seguimiento en las visitas programadas. Además, cuando los pacientes sufrieron alguna recaída durante el periodo de estudio, se extrajeron muestras de suero adicionales antes de la administración de corticoides intravenosos para tratar el brote.

Las muestras de sangre se recogieron en un tubo seco y se dejaron coagular a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron en frío (4 °C) a 1500.g durante 10 minutos. El suero obtenido se alicuotó en tubos de 0.2 mL y se conservó a -80 °C hasta ser analizado (tiempo estimado de 20 a 45 días).

3. Variables clínicas

Como variables clínicas para evaluar el estado y progresión de la enfermedad se han considerado el número de brotes anuales y la variación de la puntuación EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) a lo largo de los dos años de seguimiento:

- Se consideraron **brotes o recaídas** cuando el paciente manifestó nuevos síntomas o un empeoramiento de un síntoma previo, al menos 30 días después de haber experimentado el último ataque. Estos síntomas debían persistir al menos 24 horas en ausencia de fiebre o procesos infecciosos.

- En cuanto a la puntuación **EDSS**, se realizó una evaluación neurológica de los pacientes justo antes de comenzar el tratamiento y cada 6 meses en las visitas programadas hasta completar los dos años de seguimiento.

Se consideró **progresión de la enfermedad** cuando se produjo un incremento de la puntuación EDSS mayor de 1.5 puntos si el EDSS pre-tratamiento era de 0; de 1 punto si el EDSS pre-tratamiento estaba entre 1 y 5 y de 0.5 puntos cuando el EDSS pre-tratamiento era mayor de 5 (*Tabla 5*).

EDSS pre-tratamiento	Δ EDSS durante el seguimiento
0	1.5
1-5	1
> 5	0.5

Tabla 5. Progresión de la enfermedad en función de la variación de la puntuación EDSS

Para evaluar la **respuesta al tratamiento**, se ha tenido en cuenta la variación de la puntuación EDSS junto con el número de brotes durante los dos años de seguimiento, considerándose:

Respondedores

- puntuación EDSS final \leq EDSS pre-tratamiento
- y/o disminución del 30% en la tasa de brotes respecto al año anterior

No respondedores:

- puntuación EDSS final $>$ EDSS pre-tratamiento
- y/o al menos 2 brotes durante los dos años de seguimiento

4. Comité de Ética

Este estudio fue aprobado por el “Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos”. Todos los participantes recibieron la información necesaria pertinente del estudio y firmaron el consentimiento informado antes de su participación en el mismo.

5. ELISA Anti-HHV-6A/B IgG e IgM

Para determinar los niveles de anticuerpos anti-HHV-6A/B se utilizaron dos test de ELISA de Panbio (*Inverness, Australia*), uno para IgG y otro para IgM.

El ensayo para la cuantificación se basa en la unión de los anticuerpos anti-HHV-6A/B de las muestras de suero a un antígeno de HHV-6 que recubre la superficie de los micropocillos. Para detectar los anticuerpos que quedan unidos a la placa, se utiliza un segundo anticuerpo anti-IgG o anti-IgM conjugado con una enzima peroxidasa. Esta enzima hidroliza la tetrametilbencidina (TMB) haciendo que el pocillo de reacción adquiera color azul, que será más intenso cuanto más cantidad de anti-IgG o anti-IgM hayan quedado unidos (*Figura 15*). La intensidad se mide a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia a 600-650 nm (*Tecan*) tras adicionar ácido fosfórico 1M (para detener la reacción colorimétrica) después de incubar la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos. La absorbancia medida está directamente relacionada con la concentración de anticuerpos de tipo IgG e IgM anti-HHV-6A/B presentes en el suero del paciente.

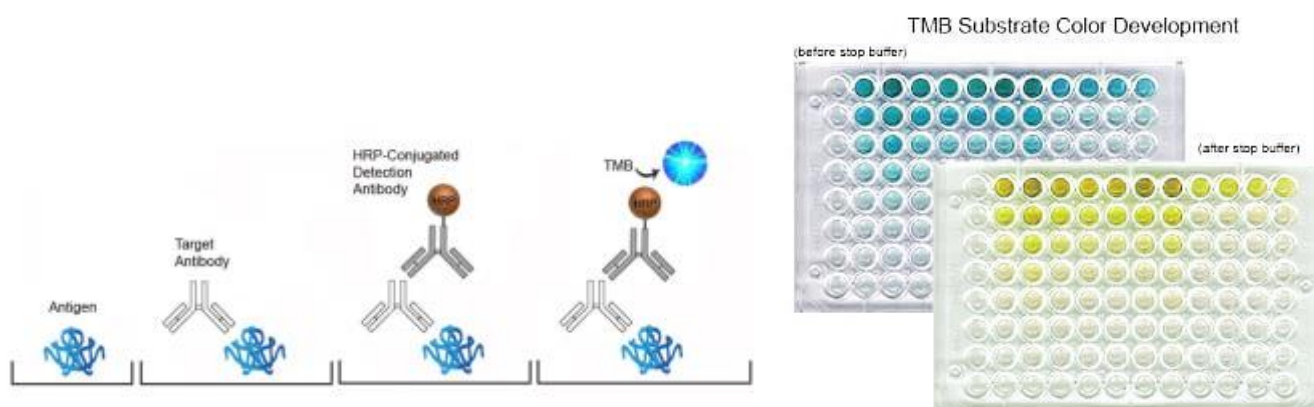


Fig 15. Esquema del ensayo ELISA para la determinación de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6A/B.

Tras adicionar el sustrato TMB/peróxido de hidrógeno, los pocillos adquieren color azul, que cambia a amarillo tras detener la reacción colorimétrica con la solución de parada (ácido fosfórico 1M).

Los resultados se expresaron en unidades Panbio (PU) que se calcularon utilizando el valor de Absorbancia obtenido para cada muestra y un valor de corte facilitado por el comerciante en cada kit de ELISA:

$$\text{Unidades Panbio (PU)} = \frac{\text{Absorbancia}}{\text{valor de corte}} \cdot 10$$

Las muestras se midieron por duplicado realizándose 2 calibraciones por placa (cada 40 muestras) con un control negativo y uno positivo por calibración.

Las muestras se clasificaron como positivas, negativas o dudosas según las PU obtenidas (*Tabla 6*).

Unidades Panbio (PU)	Clasificación del resultado
> 11	Positivo
9-11	Indeterminado
< 9	Negativo

Tabla 6. Clasificación de las muestras según el resultado en Unidades Panbio (PU)

Las muestras dudosas (PU entre 9-11) fueron analizadas una vez más para clasificarlas como positivas o negativas. En total, se encontraron 60 muestras de suero (49 de pacientes y 11 de controles sanos) con títulos entre 9-11 PU. Las muestras fueron re-analizadas obteniéndose un valor negativo para todas ellas excepto para 3 muestras pertenecientes a pacientes de EM que se clasificaron como positivas tras el nuevo análisis. En las tres muestras consideradas positivas, se obtuvieron valores de 10.8, 10.7 y 10.7 PU en un primer análisis, que tras un segundo análisis cambiaron a 11.1, 11.1 y 11.2 PU respectivamente (el coeficiente de variación inter-ensayo es menor del 5%).

6. Detección de anticuerpos neutralizantes (NAbs) contra IFN- β

Al tratarse de una proteína recombinante el uso continuado de IFN- β puede inducir la síntesis de anticuerpos con efectos neutralizantes (NAbs). La presencia de estos anticuerpos causa una disminución en la biodisponibilidad de esta citoquina produciéndose una reducción de la eficacia del tratamiento.

De cara a la posibilidad de que se generen este tipo de anticuerpos y teniendo en cuenta que podrían afectar a la respuesta al tratamiento con IFN- β de los pacientes incluidos en el estudio, se han determinado los niveles de NAbs en el grupo de pacientes tratados con interferones.

Los NAbs se midieron en el suero de los pacientes cada 6 meses tras comenzar el tratamiento hasta completar los dos años de seguimiento. La sangre obtenida se mantuvo en frío desde la extracción, obteniéndose el suero mediante centrifugación a 4°C. A continuación, el suero fue inactivado mediante calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Es importante tener la precaución de recoger las muestras de sangre al menos 36 horas después de la última inyección de IFN- β (36-48 h) para evitar que el

fármaco administrado al paciente interfiera en el ensayo enmascarando la presencia de los anticuerpos neutralizantes.

La determinación de NAbs se llevó a cabo mediante un ensayo de efecto citopático (CPE), en el que se utilizaron dos líneas celulares (A549 y L929), tres tipos de IFN- β (*Betaferon*®, *Rebif*® y *Avonex*®) y el virus de la encefalomiocarditis murina. El protocolo para realizar el ensayo consta de los siguientes pasos:

1. Se crecen las células en medio DMEM 10% FSB (Fetal Serum Bovine) hasta confluencia en placas de 96 pocillos.
2. Las células se incuban a 37°C durante 20 horas aproximadamente con diluciones seriadas del suero del paciente y con diferentes títulos del IFN- β con el que está siendo tratado (para evaluar si se han desarrollado anticuerpos frente a ese fármaco en concreto). El diseño de la placa, en cuanto a las diluciones del suero del paciente y las diluciones del fármaco, depende de los resultados obtenidos previamente para los títulos de NAbs en el paciente estudiado (*Figura 16*). Lo más habitual es poner 4 diluciones seriadas a 1:2 del suero de cada paciente.
3. A continuación, se ponen en contacto las células con el virus y se dejan incubando 24 horas a 37°C.
4. Transcurrido este tiempo, se puede observar al microscopio óptico si las células han sido infectadas. En los casos en los que el virus consigue infectar a las células es porque el IFN- β no puede ejercer su papel protector frente a la infección viral porque el suero del paciente contiene NAbs que neutralizan su acción.

5. Para cuantificar los NAbs, las células se tiñen con cristal violeta con el fin de leer las placas con un espectrofotómetro (*Tecan*). La lectura se lleva a cabo a una longitud de onda de 620 nm y sin filtro de referencia. Cuando los pocillos quedan oscuros es indicativo de que las células están vivas y cuando los pocillos se ven claros, indica que las células están muertas, pudiendo cuantificarse la viabilidad celular. De esta manera, en función de las diluciones de suero-IFN- β de los pocillos en los que las células han conseguido sobrevivir, se puede determinar la presencia y cantidad de NAbs en el suero del paciente estudiado.

		NO INF	IFN	NO INF	IFN	NO INF	IFN	NO INF	IFN	NO INF	IFN	NO INF
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IFN	1:1	S1	1:2,5	S3	1:2,5	S5	1:10	S6	1:40	SC	SC
B	IFN	1:2	S1	1:5	S3	1:5	S5	1:20	S6	1:80	SC	SC
C	IFN	1:4	S1	1:10	S3	1:10	S5	1:40	S6	1:160	SC	SC
D	IFN	1:8	S1	1:20	S3	1:20	S5	1:80	S6	1:320	SC	SC
E	IFN	1:16	S2	1:2,5	S4	1:2,5	S5	1:160	S6	1:640	SV	SV
F	IFN	1:32	S2	1:5	S4	1:5	S5	1:320	S6	1:1280	SV	SV
G	IFN	1:64	S2	1:10	S4	1:10	S5	1:640	S6	1:2560	SV	SV
H	IFN	1:128	S2	1:20	S4	1:20	S5	1:1280	S6	1:5120	SV	SV

Fig 16. Ejemplo de esquema de organización de una placa con 6 pacientes diferentes: 4 con diluciones de 1:2,5 a 1:20; 1 paciente con diluciones de 1:10 a 1:1280 y otro paciente con diluciones de 1:40 a 1:5120. **SC:** Células + DMEM (sin interferón): 100% de viabilidad. **SV:** Células + DMEM + virus (sin interferón): 50% de viabilidad; el virus debe de estar a una concentración que mate el 50% de las células.

Los títulos de NAbs fueron calculados de acuerdo a la fórmula de Kawade¹¹¹ y se expresaron en unidades TRU (Ten-fold Reduction Units) /mL. Las muestras se consideraron como positivas cuando los títulos fueron > 20 TRU/mL.

7. Análisis genético

7.1. Aislamiento, cuantificación y pureza del ADN

Se recogieron 10 mL de sangre periférica de cada paciente, se aislaron los leucocitos y a partir de ellos se extrajo el ADN mediante el método *salting out*¹².

La concentración de ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante un espectrofotómetro (*NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA*), teniendo en cuenta que cada unidad de densidad óptica corresponde a 50 ng/μl de ADN. La pureza del ADN genómico, se estimó mediante el ratio de la absorbancia a 260 nm (característica de ácidos nucleicos) y la absorbancia a 280 nm (característica de proteínas). Se consideró el ADN libre de proteínas cuando este cociente (A_{260nm}/A_{280nm}) presentó un valor comprendido entre 1.7-1.8.

Teniendo en cuenta los valores de concentración y pureza obtenidos, se prepararon diluciones de ADN a una concentración de 10 ng/μl para llevar a cabo los estudios de genética molecular.

7.2. Genotipado HLA

Para llevar a cabo el tipaje HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 se utilizó una PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid*). Para realizar esta técnica, primero se amplifica el exón 2 de cada uno de estos genes mediante PCR, ya que en este exón es donde se concentran los polimorfismos que distinguen los alelos. A continuación, se transfiere el producto amplificado a una membrana de nitrocelulosa (Dot-Blot), donde se lleva a cabo una hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas de alelo marcadas con digoxigenina que emite

fluorescencia. La identificación de los alelos se lleva a cabo leyendo la emisión en cada punto transferido a la membrana.

7.3. Genotipado del alelo HLA-DRB1*15:01

La presencia del alelo DRB1*15:01 (principal alelo de susceptibilidad para EM), se estudió en aquellos individuos en los que el tipaje PCR-SSOP indicó la presencia del haplotipo HLA-DRB1*02. Para ello, se llevó a cabo el genotipado del SNP rs3135388 (T/C), ya que presenta una correlación mayor del 0.94 con el alelo DRB1*15:01^{113,114}.

El análisis de este SNP se realizó mediante PCR a tiempo real (rt-PCR) utilizando sondas Taqman® en un equipo ABI PRISM 7900HT (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Para realizar los ensayos Taqman®, además de los reactivos habituales de una PCR (DNA polimerasa, buffer, MgCl₂, nucleótidos y primers) se necesita una amperasa (para degradar amplicones inespecíficos) y las sondas Taqman® específicas del SNP que se quiere estudiar.

Las sondas Taqman® contienen un fluoróforo en su extremo 5' y un *quencher* (secuestrador de fluorescencia) en su extremo 3' a una distancia adecuada para que la emisión del fluoróforo sea capturada por el *quencher* y no se pueda detectar. Cuando se está realizando la amplificación por PCR de un fragmento de DNA que tiene unida una sonda Taqman®, la actividad exonucleasa de la polimerasa degrada la sonda, lo que conlleva que el *quencher* se aleje del fluoróforo emisor y por tanto se pueda detectar la fluorescencia. Para el análisis de SNPs se utilizan dos sondas Taqman®, cada una marcada con un fluoróforo distinto y con el oligonucleótido específico del polimorfismo que se quiere estudiar. De esta manera, el color detectado cuando se degrada la sonda al realizar la PCR, es indicativo del oligonucleótido del SNP que contiene el fragmento del ADN estudiado. En este caso, se han utilizado

como fluoróforos emisores, FAM (6-carboxifluoresceína) que emite a 494 nm (azul) y VIC (4,7,2',4',5',7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína) que emite a 538 nm (verde). Cuando se ponen en contacto estas sondas con el ADN del paciente objeto de estudio, en función del oligonucleótido que contenga el SNP, se unirá específicamente una sonda o la otra y cuando se degraden por acción de la polimerasa (*TaqGold*, *Applied Biosystem*), se detectará fluorescencia de color azul o verde según la sonda unida, lo que permitirá identificar el oligonucleótido del SNP del paciente estudiado (Figura 17).

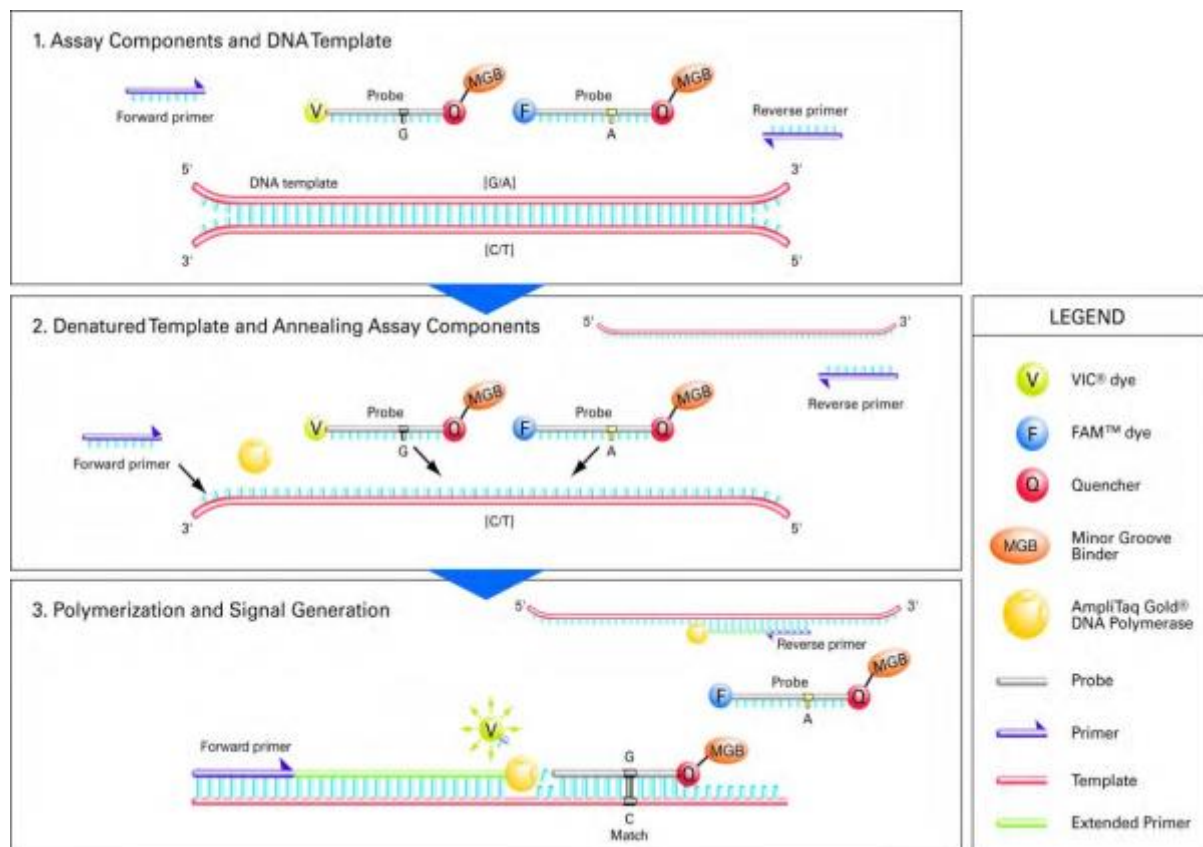


Fig 17. Esquema del proceso de la rt-PCR realizada con tecnología Taqman®. Cuando la sonda marcada con FAM o VIC encuentra el fragmento de DNA complementario se une a él, de manera que cuando la polimerasa degrada la sonda, la emisión azul o verde indicará el oligonucleótido específico del SNP en el ADN objeto de estudio.

https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays_man.pdf

Las condiciones de la PCR utilizada para el genotipado de SNPs mediante sondas Taqman® fueron:

- 2 minutos a 50°C: activación de la enzima amperasa
- 10 minutos a 95°C: activación de la enzima polimerasa e inactivación de la enzima amperasa
- 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (hibridación y elongación).

7.4. Genotipado SNPs-GWAS

El genotipado de los SNPs-GWAS se realizó en el CEGEN con la tecnología iPLEX® Gold MassARRAY Sequenom¹¹⁵.

Esta técnica consiste en la identificación del oligonucleótido del SNP objeto de estudio mediante el análisis del tamaño de fragmentos de ADN utilizando espectrometría de masas (*Figura 18*).

Para ello, primero se realiza la amplificación de los fragmentos de ADN que contienen los SNPs que se quieren estudiar mediante una PCR multiplex. A continuación, se lleva a cabo una reacción de extensión de base única (SBE) utilizando sondas modificadas con distintas masas que hibridan justo después del oligonucleótido que se quiere identificar. De esta forma, la amplificación se detiene y generan por tanto, fragmentos de distintos tamaños en función del oligonucleótido que contiene el SNP. La discriminación alélica se realiza mediante el análisis de los fragmentos obtenidos utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight*).

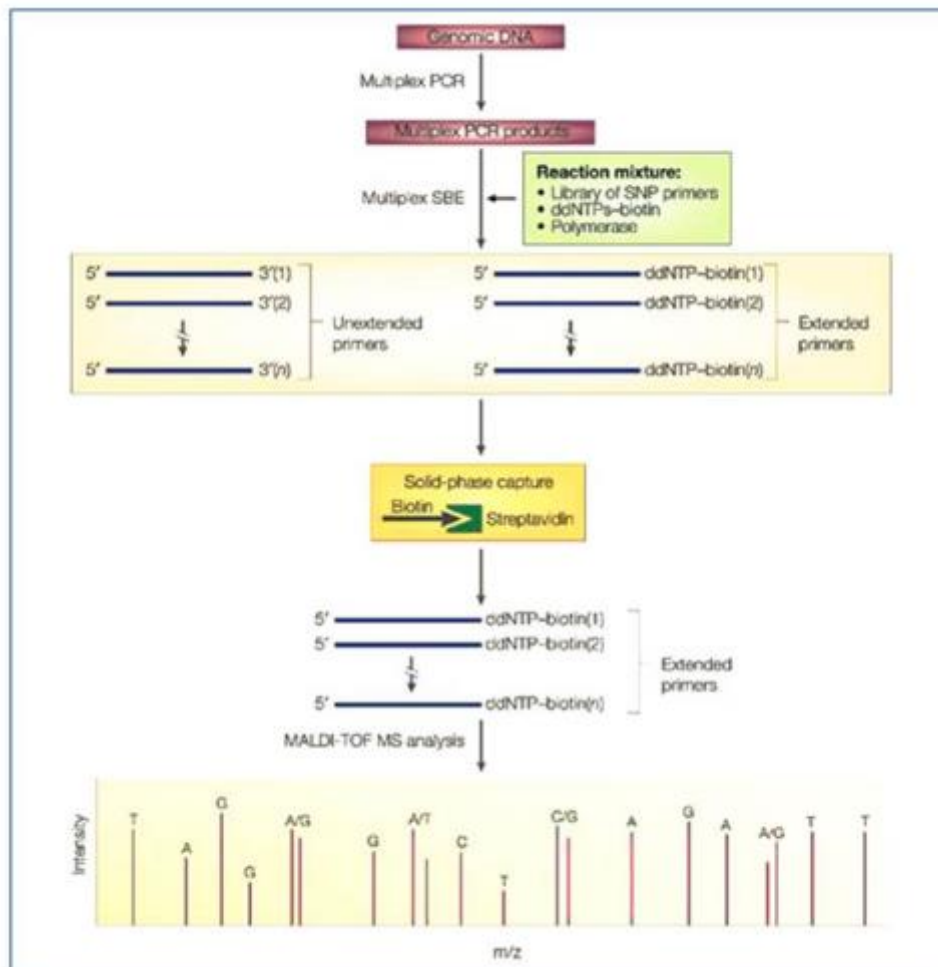


Fig 18. Tecnología iPLEX® Gold MassARRAY Sequenom. En función del oligonucleótido del SNP, el tamaño del fragmento obtenido tras la reacción SBE (extensión de base única) será distinto. Esto permite realizar la discriminación alélica mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Las reacciones de PCR y de SBE tienen lugar en placas de 384 pocillos, pudiéndose transferir de forma automatizada a la placa del espectrómetro de masas los productos obtenidos. Utilizando esta tecnología se pueden genotipar hasta 36 variantes por ensayo.

7.5. SNPs genotipados:

De los 57 SNPs que han sido relacionados con el riesgo de padecer EM en uno de los últimos estudios GWAS del grupo internacional de genética de EM¹¹⁵, se han seleccionado 42 para llevar a cabo los estudios de asociación propuestos en este trabajo (*Tabla 17*).

Tabla 7. Descripción de los 42 SNPs seleccionados

	SNP (gen)	Funciones
1	rs10201872 (C/T): Gen SP140. Alelo de frecuencia menor (MAF): T=0.100/217.	Codifica la proteína SP140, proteína con dominio de zinc que forma parte del cuerpo nuclear. Participa en funciones de regulación del sistema inmune y de transcripción.
2	rs10466829 (A/G): Gen CLECL1. MAF: A=0.498/1084.	Codifica la proteína C-tipo lectin-like domain family 1. Actúa como molécula co-estimuladora de las células T, favoreciendo respuestas de tipo Th2 y aumentando la producción de IL-4.
3	rs11129295 (C/T): Gen EOMES (Eomesodermin homolog). MAF: C= 0.494/1076.	Regula la transcripción de genes efectores líticos participando en la diferenciación de los linfocitos T CD8+ durante la respuesta inmune. Su expresión aumenta en presencia de TGFB1 e IL-4.
4	rs11154801 (A/C): Gen MYB. MAF: A=0.287/626.	Protooncogen de la familia MYB ("mioblastosis") de factores de transcripción. Participa en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta Th2, mediante la regulación de funciones de diferenciación y proliferación de los progenitores hematopoyéticos.
5	rs11810217 (C/T): Gen EVI5 (Ecotropic viral integration site 5). MAF: T=0.153/334.	Oncogén regulador del ciclo celular. Su depleción provoca alteraciones y detención de la mitosis.
6	rs12212193 (A/G): Gen BACH2. MAF: G=0.300/653.	Factor de transcripción de la familia bZIP (basic leucine zipper). En modelos animales se ha visto que este gen puede participar en la maduración de las células B, en la producción de inmunoglobulinas y en la formación de células T reguladoras (Treg) y disminución de la diferenciación a células T efectoras Th1, Th2 y Th17.
7	rs12368653 (A/G): Gen CYP27B1. MAF: A=0.317/690.	Enzima de la familia del citocromo p450 localizada en la membrana interna mitocondrial. Participa en el metabolismo de la vitamina D hidroxilando la 25-hidroxi-vitamina D3 para formar la forma activa 1,25-dihidroxi-vitamina D3

8	rs12466022 (A/C): Gen no conocido. MAF: A=0.304/663	
9	rs1250550 (G/T): Gen ZMIZ1. MAF: T=0.295/643.	Factor de transcripción que está implicado en diversos procesos celulares poco descritos hasta la fecha.
10	rs13192841 (A/G): Gen no conocido. MAF: A=0.189/411	
11	rs13333054 (C/T): Gen IRF8. MAF: T= 0.302/657.	Factor de transcripción de la familia de factores reguladores de los IFN de tipo I (IFN- α e IFN- β) y genes del HLA-I inducibles por IFN. Se encuentra mayoritariamente en células del SI donde actúa regulando su diferenciación y la respuesta inmunitaria a través de la unión con el heterodímero BATF-JUN.
12	rs1335532 (C/T): Gen CD58 o LFA-3. MAF: C=0.382/832.	Se expresa en células presentadoras de antígeno (APC). Es el ligando del receptor CD2 de células T y actúa favoreciendo la unión entre ambos tipos celulares.
13	rs140522 (A/G): Gen SCO2. MAF: A=0.376/819.	Proteína de ensamblaje para la síntesis de la citocromo C oxidasa. Permite la unión de Cobre a dicha enzima para su correcto funcionamiento de cara a la producción de energía en la cadena respiratoria mitocondrial. Mutaciones de esta proteína se han asociado con una forma fatal de cardio-encefalo-miopatía infantil.
14	rs1520333 (C/T): Gen IL7. MAF: C=0.415/904.	Interleuquina que actúa sobre los progenitores linfoides inmaduros favoreciendo su desarrollo, especialmente las células B.
15	rs17066096 (A/G): Gen IL22RA2. MAF: G=0.172/375.	Codifica para una proteína soluble que se une al receptor de IL-22 actuando como antagonista de esta citoquina y evitando sus acciones inflamatorias.
16	rs17174870 (C/T): Gen MERTK. MAF: T=0.218/475.	Protein-quinasa. Se ha relacionado con diversas funciones celulares, entre las que destacan diferenciación celular, migración celular y fagocitosis de células apoptóticas. A nivel inmunológico tiene acciones antiinflamatorias, regulando vías de señalización de citoquinas inflamatorias a través de la inhibición de los receptores Toll-like
17	rs1738074 (A/G): Gen TAGAP. MAF: A=0.441/961.	Participa en procesos de activación de células T.
18	rs2019960 (C/T): Gen PVT1. MAF: C=0.243/530.	Oncogen relacionado con el factor de transcripción c-myc. Se encuentra alterado en diferentes tumores, principalmente neuroblastoma y procesos linfoproliferativos.
19	rs2119704 (A/C): Gen GALC MAF: A=0.129/280.	Galactocerebrosidasa. Metaboliza la galactosil-ceramida, uno de los principales lípidos de la mielina.

20	rs2243123 (C/T): Gen IL12A. MAF: C=0.198/431	Subunidad alfa de la IL-12. Esta subunidad es necesaria para la inducción de IFN- β independiente de linfocitos T y para la diferenciación de las células Th1 y Th2.
21	rs2248359 (C/T): Gen CYP24A1. MAF: T=0.439/956.	Codifica la proteína 1,25 dihidroxi-vitamina D3 hidroxilasa, proteína de la familia del citocromo p450, que participa en el metabolismo del calcio, iniciando la degradación de la vitamina D activa.
22	rs2283792 (G/T): Gen MAPK1. MAF:T=0.459/1000	Pertenece a la familia de las proteín-quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Interviene como factor de transcripción en múltiples procesos celulares, como división celular, endocitosis, quimiotaxis y apoptosis. A nivel inmunológico y en modelos animales, se ha observado que produce una disminución de los linfocitos CD4 y CD8 maduros.
23	rs2293370 (C/T): Gen CD80. MAF: T=0.210/458.	Molécula co-estimuladora presente en las APCs. Media la unión con los linfocitos T durante la presentación antigénica.
24	rs2300603 (C/T): Gen BATF. MAF: C=0.221/481.	Pertenece a la superfamilia de activadores de la proteína 1 (AP-1) de los factores de transcripción bZIP. Actúa en la elaboración y mantenimiento de la respuesta inmune regulando la activación de varios linajes celulares, entre los que se encuentran la diferenciación hacia células Th17, células T foliculares (Thf), células dendríticas, células CD8 y células B.
25	rs22303759 (G/T): Gen CD37 MAF: G=0.270/588.	Proteína de la superfamilia de transmembrana-4. Presente mayoritariamente en la superficie celular de los linfocitos B. Podría intervenir en la transducción de diferentes funciones celulares y en las interacciones entre linfocitos T y B.
26	rs2546890 (A/G): Gen IL12B. MAF: A=0.433/944.	Subunidad beta de la interleuquina inflamatoria IL-12.
27	rs3118470 (C/T): Gen IL2RA. MAF: C=0.319/694.	Subunidad α del receptor de IL-2, también denominada CD25. La unión de la IL-2 a su receptor induce la proliferación de diferentes poblaciones linfocitarias. Es la diana del fármaco inmunosupresor daclizumab
28	rs4410871 (C/T): Gen MYC. MAF: T=0.298/650.	Protooncogen implicado en la regulación de la división y el ciclo celular.
29	rs4613763 (C/T): Gen PTGER4. MAF: C=0.110/239.	Receptor 4 de la prostaglandina E, con acciones anti-inflamatorias.
30	rs4648356 (A/C): Gen MMEL1. MAF: A=0.420/914.	Metallo-endopeptidasa de membrana tipo 1. Se conoce poco sobre las funciones de este gen. Se supone que, al igual que otras metaloproteasas, está implicada en la degradación de diversos péptidos de pequeño tamaño.

31	rs4902647 (C/T): Gen ZFP36L1 MAF: C=0.497/1083.	Codifica la proteína "zinc finger protein C3H1 type-like 1" o también conocida como factor de respuesta al butirato. Es un factor de transcripción celular del grupo de los genes de respuesta rápida. Interviene en múltiples acciones celulares, especialmente en la respuesta a factores de crecimiento, y, en menor medida, en la regulación de células T y B.
32	rs669607 (G/T): Gen no conocido MAF: T=0.389/847	
33	rs7200786 (A/G): Gen CLEC16A. MAF: A=0.492/1072.	Proteína con dominio de lectina tipo C. Presente en células B, Natural Killers y células dendríticas. Asociada con el riesgo de desarrollar diferentes enfermedades autoinmunes
34	rs7238078 (G/T): Gen MALT1. MAF: G=0.226/492.	Paracaspasa esencial en la activación de células T, y, en menor medida, de las células B, a través del factor de transcripción Nuclear Factor Kappa Beta (NF- κ β).
35	rs7522462 (A/G): Gen KIF21B. MAF: A=0.150/326.	Codifica una proteína de tipo quinesina, cuya acción principal es el transporte axonal. Dada esta función, se especula que podría tener un papel neurodegenerativo en la EM.
36	rs7595037 (C/T): Gen PLEK. MAF: C=0.352/767.	Codifica la proteína Pleckstrin. Es uno de los principales sustratos de la PKC de las plaquetas. No se conoce con exactitud su función, aunque se postula que podría actuar regulando diferentes funciones celulares (agregación plaquetaria y coagulación, organización del citoesqueleto, diferenciación de células hematopoyéticas, señalización y tráfico celular, entre otras...).
37	rs7923837 (A/G): Gen HHEX. MAF: A=0.427/930.	Forma parte de los factores de transcripción de la familia homeobox. En modelos animales se ha encontrado la participación de este gen en la formación de células B y producción de anticuerpos.
38	rs802734 (C/T): Gen THEMIS. MAF: C=0.198/432	Controla la correcta maduración y selección de los linfocitos T
39	rs8112449 (A/G): Gen TYK2. MAF: A=0.351/765	Tirosin-quinasa 2. Interviene en las vías de señalización de los IFN-I e IFN-II y varias citoquinas entre las que se encuentran la IL-12, IL-6, IL-10 e IL-23.
40	rs874628 (C/T): Gen MPV17L2. MAF: C=0.192/418.	Proteína-2 de membrana de mitocondria. Se desconoce su función exacta.
41	rs9282641 (A/G): Gen CD86. MAF: A=0.050/109.	Molécula co-estimuladora de los linfocitos T.

42	rs949143 (A/G): Gen ARL6IP4 MAF: G=0.462/1007.	Codifica para una proteína de función desconocida, aunque se piensa que puede intervenir en funciones de "splicing".
----	---	--

8. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se han utilizado los programas SPSS Statistic® para Windows (versión 15.0) y STATCALC (Epi Info™ v.6.02; CDC, Atlanta, USA).

Las variables cualitativas se han descrito en base a su distribución de frecuencias.

Las variables cuantitativas se han representado con su media, mediana, desviación estándar e intervalos de confianza (I.C.) al 95%. Las variables cuantitativas no siguieron una distribución normal, por lo que se usaron test no paramétricos para su análisis.

Para estudiar la relación de los títulos de anticuerpos IgG e IgM entre la población sana y los pacientes con EM se consideró la media de los valores basales en ambas poblaciones.

Para realizar los estudios de asociación entre los títulos de anticuerpos y la respuesta terapéutica a los distintos tratamientos, se ha calculado el cambio porcentual de IgG e IgM al final de los dos años de seguimiento respecto al valor basal.

Para estudiar la relación entre la progresión de la enfermedad (evaluada como la variación de la puntuación EDSS) y los niveles de IgG, los títulos de anticuerpos se han clasificado en grupos según el valor de unidades Panbio, en función de si duplicaban (> 22 PU), triplicaban (> 33 PU) o cuadruplicaban (> 44 PU) el valor de corte que marca la positividad del test (> 11 PU).

Por último, los títulos de anticuerpos IgG e IgM se utilizaron como una variable cuantitativa continua para estudiar su relación con los brotes o recaídas que sufrieron los pacientes durante los dos años de seguimiento.

Para el análisis de las variables cuantitativas, se utilizaron los test no paramétricos de Kruskal-Wallis o el test de Wilcoxon rechazándose la hipótesis nula cuando $p > 0.05$ y utilizándose la odds ratio (OR) como medida de asociación cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

El estudio de la asociación de las variantes alélicas del sistema HLA y los SNPs con los niveles basales de los títulos de anticuerpos IgG e IgM, así como con su cambio porcentual durante los dos años de seguimiento, se realizó mediante tablas de contingencia por el procedimiento CROSSTABS de SPSS Statistic®. Se utilizó como medida de asociación la OR, y para la estimación de la significación estadística se empleó la prueba de Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de dos colas de Fisher's y el intervalo de confianza de la OR al 95%.

En todas las pruebas realizadas el grado de significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

RESULTADOS



1. Serología anti-HHV-6A/B en pacientes con EM y controles sanos

1.1. Serología IgG anti-HHV-6A/B

La prevalencia en pacientes con EM fue del 98%, mientras que en controles sanos fue del 93.4% (*Tabla 8*) encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones ($p = 0.005$). También se obtuvo un valor medio basal de los títulos de IgG significativamente mayor en pacientes con EM que en la población libre de enfermedad ($p = 0.0002$).

1.2. Serología IgM anti-HHV-6A/B:

En cuanto a los anticuerpos IgM, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a pesar de que la prevalencia en pacientes con EM fue mayor (8.3%) que en controles sanos (5.6%). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a los valores medios de los títulos de anticuerpos IgM entre los pacientes con EM y los controles sanos (*Tabla 8*).

	Prevalencia			Título medio (PU)		
	Basal	Controles sanos	p	Basal	Controles sanos	p
Anti-HHV6A/B	98%	93.4%	0.005	26.8	23.1	0.0002
IgG	(295/301)	(315/337)				
Anti-HHV6A/B	8.3%	5.6%	0.184	4.4	4.0	0.100
IgM	(25/301)	(19/337)				

Tabla 8. Prevalencias y valores medios de los títulos de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6A/B de población sana y de pacientes con EM.

2. Serología anti-HHV-6A/B en pacientes con EM en función del tratamiento

2.1. Serología IgG anti-HHV-6A/B

Al analizar la variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B durante los dos años de seguimiento se observó una reducción significativa ($p = 0.044$) en los niveles de anticuerpos entre los valores basales y a los 24 meses, encontrándose que los títulos de IgG bajaban una media del 20% en el 62.8% de los pacientes (*Tabla 9*).

Al considerar cada uno de los tratamientos por separado, se observó que los pacientes tratados con NTZ fueron los que experimentaron una mayor reducción de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B pasando de una media basal de 27.4 PU a un valor medio de 24.3 PU a los dos años ($p = 0.033$).

Respecto a los pacientes tratados con AG, también se observó una reducción de los títulos de los anticuerpos aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.105$) entre los niveles basales y los valores tras los dos años de tratamiento.

Entre los pacientes tratados con IFN- β , prácticamente no hubo variación en la media de los títulos de IgG a lo largo de los dos años de seguimiento. Cuando se consideraron sólo los pacientes que no desarrollaron NAbs a lo largo del estudio (el 32.8% (43/131) de los pacientes tratados con IFN- β fueron positivos para NAbs al menos una vez durante el seguimiento), los resultados fueron similares respecto a los obtenidos al considerar la población completa de pacientes tratados con IFN- β , no encontrándose una disminución significativa entre los niveles basales de IgG y a los 24 meses.

También cabe destacar que el porcentaje de pacientes en los que disminuyeron los títulos de IgG fue mayor cuando se les trató con NTZ (71%) que cuando se les administró IFN- β o AG (alrededor de un 60%).

Anti-HHV-6A/B IgG				
Título medio (PU)				Variación IgG
	Basal	Dos años	p	Disminución media del 20%
TOTAL	26.8	25.4	0.044	62.8% (189/301)
IFN-β	24.3	24.1	0.439	58.0% (76/131)
IFN-β sin NAbs	24.2	24.1	0.930	57.5% (50/87)
AG	30.0	27.9	0.105	59.5% (53/89)
NTZ	27.4	24.3	0.033	71.2% (57/80)

Tabla 9. Prevalencias y valores medios de los títulos de anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B tras dos años de seguimiento con los tres tratamientos estudiados.

2.2. Serología IgM anti-HHV-6A/B

Respecto a la serología de IgM, se observó una disminución de la prevalencia a lo largo del estudio, ya que de los 25 pacientes encontrados con IgM positiva antes de comenzar el tratamiento, sólo 16 de ellos mantuvieron la positividad a los 24 meses. De los 9 pacientes que negativizaron los títulos para IgM, 4 de ellos fueron tratados con AG y 5 con NTZ (*Tabla 10*).

Al igual que ocurrió con la serología de IgG, también se observó una reducción significativa ($p = 0.003$) de los títulos de IgM anti-HHV6A/B a lo largo del estudio, disminuyendo en la mayoría de los pacientes (67.7%) una media del 35%.

Al considerar los tratamientos por separado, los pacientes a los que se administró NTZ fueron los que presentaron una reducción más acusada de los títulos de IgM ($p = 0.024$), disminuyendo en el 75% de los pacientes tratados con *Tysabri®*.

En los pacientes tratados con IFN- β también se observó una reducción en los títulos de IgM, aunque no se llegaron a encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.057$) cuando se consideró la población completa tratada con este fármaco. Sin embargo, teniendo en cuenta sólo a los pacientes que no desarrollaron NAb durante el estudio, se observó que los títulos de IgM sí se redujeron significativamente ($p = 0.036$) tras los dos años de tratamiento.

Por último, con respecto al AG, no se observó una variación significativa ($p = 0.136$) en relación a los títulos de IgM a lo largo de los dos años del estudio.

Anti-HHV-6A/B IgM							
	Prevalencia			Título medio (PU)			Variación IgM
	Basal	Dos años	p	Basal	Dos años	p	Disminución media del 35%
TOTAL	8.3% (25/301)	5.3% (16/301)	0.145	4.4	3.6	0.003	67.8% (204/301)
IFN-β	6.1% (8/131)	6.1% (8/131)	1	4.1	3.5	0.057	62.6% (82/131)
IFN-β sin NAb	8% (7/87)	8% (7/87)	1	4.4	3.4	0.036	56% (46/82)
AG	11.2% (10/89)	6.7% (6/89)	0.295	4.8	4.2	0.136	69.7% (62/89)
NTZ	8.6% (7/81)	2.5% (2/81)	0.086	4.5	3.1	0.024	75% (60/80)

Tabla 10. Prevalencias y valores medios de los títulos de anticuerpos IgM anti-HHV-6A/B tras dos los años de seguimiento con los tres tratamientos estudiados.

3. Serología anti-HHV-6A/B y respuesta clínica en función del tratamiento

De los 301 pacientes incluidos en el estudio, el 58.1% (175/301) se consideraron respondedores al tratamiento, ya que no sufrieron recaídas ni progresión de la enfermedad durante los dos años de seguimiento.

Al estudiar cada uno de los fármacos por separado, fue el grupo de pacientes tratados con NTZ donde se encontró mayor número de respondedores con un 71.3% (57/80) de los pacientes. Donde se obtuvo la peor respuesta, fue en el grupo de pacientes a los que se administró AG donde sólo el 49% (44/89) estuvieron libres de recaídas y progresión de la enfermedad.

En cuanto a los pacientes tratados con IFN- β , se encontró un 60% (79/131) de respondedores, porcentaje que aumentó ligeramente hasta un 63.2% (55/87) cuando se consideraron sólo los pacientes tratados con IFN- β que no desarrollaron NABs a lo largo del estudio (*Figura 19*).

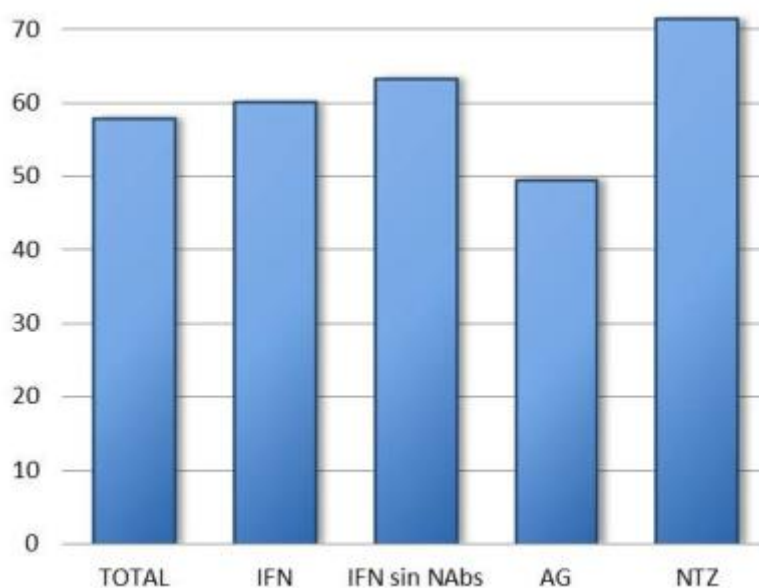


Fig 19. Porcentaje de pacientes con EM respondedores a los tratamientos: IFN- β , AG y NTZ

3.1. Serología IgG anti-HHV-6A/B y respuesta al tratamiento

Al estudiar la relación entre la respuesta al tratamiento y la serología IgG anti-HHV-6A/B, se observó que en la mayoría de los pacientes en los que disminuyeron los títulos a lo largo del estudio se produjo una respuesta clínica favorable (*Figura 20*), mientras que el porcentaje de pacientes respondedores al tratamiento cuando los anticuerpos IgG aumentaron, fue significativamente menor ($p = 0.0000015$).

No sólo se observó relación entre una mejor evolución de la enfermedad y la disminución de los anticuerpos IgG, sino que también se encontró asociación entre el porcentaje de disminución de los anticuerpos y el número de respondedores (*Figura 21*), de manera que cuando los títulos de IgG llegaron a disminuir más de un 20% se encontraron más pacientes libres de enfermedad que cuando se produjeron variaciones más pequeñas (del 10% o del 5%). Igualmente, se observó el efecto contrario en el caso del aumento de los anticuerpos IgG, ya que mientras mayor fue el incremento, la proporción de pacientes que evolucionaron favorablemente fue menor. En concreto, las mayores diferencias en el porcentaje de respondedores se encontraron entre los grupos de pacientes en los que los títulos de IgG variaron más de un 20% ($p = 0.0000004$; O.R. = 13.8).

Cuando se consideraron cada uno de los tratamientos por separado, se observó una tendencia similar en todos ellos, encontrándose un número significativamente mayor de respondedores cuando los anticuerpos IgG disminuyeron, siendo este efecto más evidente cuando la variación en los títulos de anticuerpos superaba el 20%.

Las mayores diferencias se encontraron entre los pacientes tratados con NTZ (*Figura 25*), ya que el 77.6% de los pacientes estuvieron libres de recaídas y progresión cuando los anticuerpos IgG disminuyeron, mientras que sólo un 30.4% de los pacientes respondieron favorablemente al tratamiento ($p = 0.00007$; O.R. = 7.9)

cuando los anticuerpos IgG aumentaron, encontrándose de nuevo la mayor significación estadística al considerar los grupos de pacientes en los que los títulos de IgG variaron más del 20% ($p = 0.000029$).

En cuanto a los pacientes tratados con AG se observó la misma tendencia que en los pacientes a los que se administró NTZ (*Figura 24*), aunque en este caso las diferencias fueron menores, encontrándose un 61% de respondedores en el grupo de pacientes en los que disminuyeron los títulos de IgG, frente a un 33% de respondedores en el grupo de pacientes en los que los títulos de IgG aumentaron ($p = 0.012$; O.R. = 2.8).

Respecto a los pacientes tratados con IFN- β , aunque las diferencias encontradas fueron menores aún, igualmente se observó que cuando los títulos de IgG disminuyeron, el porcentaje de pacientes libres de enfermedad y recaídas fue significativamente mayor ($p = 0.032$; O.R. = 2.1) que cuando los títulos de IgG aumentaron (*Figura 22*). Cabe destacar, que cuando se consideraron sólo los pacientes tratados con IFN- β negativos para NAbs, se observó un aumento considerable en la cifra de respondedores entre los pacientes en los que los títulos de IgG disminuyeron (*Figura 23*), llegando a encontrarse hasta un 78% de pacientes libres de recaídas y progresión de la enfermedad, frente a un tan sólo un 42.1% de pacientes respondedores cuando los anticuerpos IgG aumentaron ($p = 0.0006$; O.R. = 4.9). Al igual que ocurría en los casos anteriores, las diferencias encontradas entre los porcentajes de respondedores fue aún mayor ($p = 0.0002$; O.R. = 18.4) cuando se compararon los grupos de pacientes donde la variación de los anticuerpos estuvo por encima del 20%.

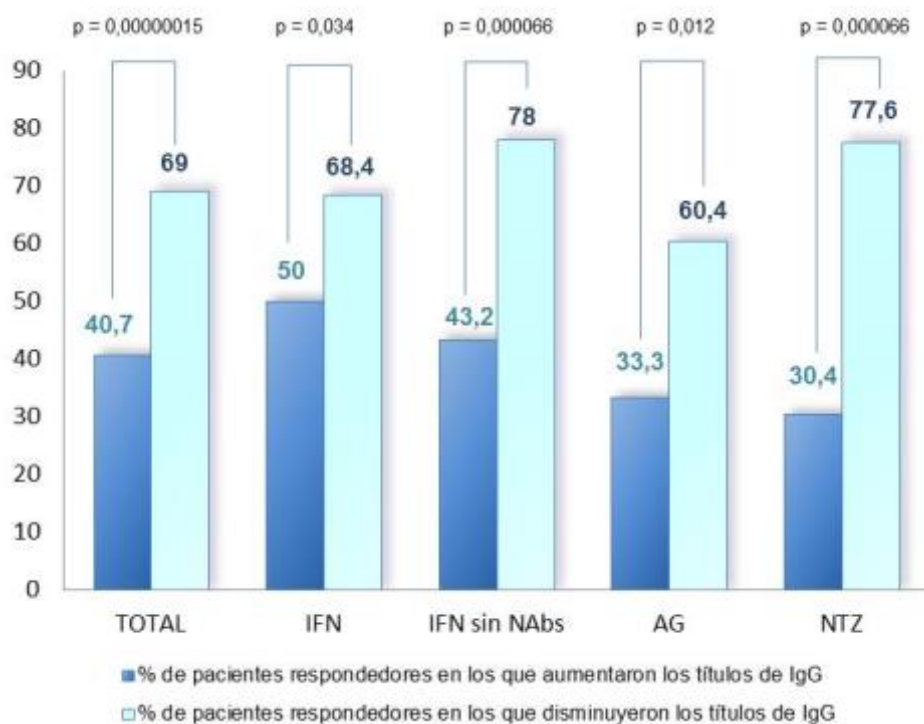


Fig 20. Porcentaje de pacientes respondedores: pacientes con EM libres de recaídas y progresión de la enfermedad en función del tratamiento.

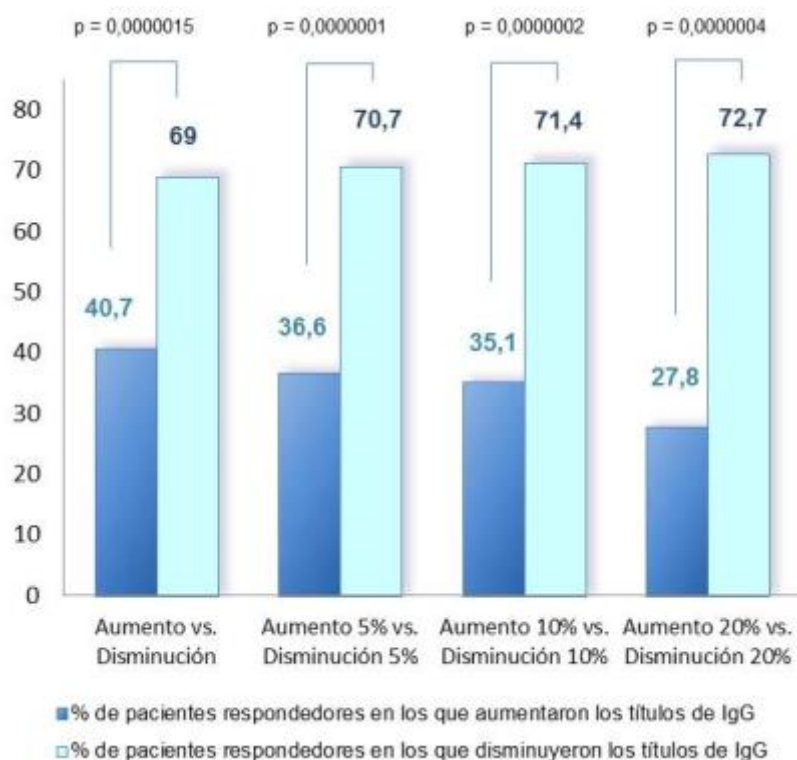


Fig 21. Porcentaje de pacientes respondedores: pacientes con EM libres de recaídas y progresión de la enfermedad en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B a lo largo de los dos años de tratamiento.

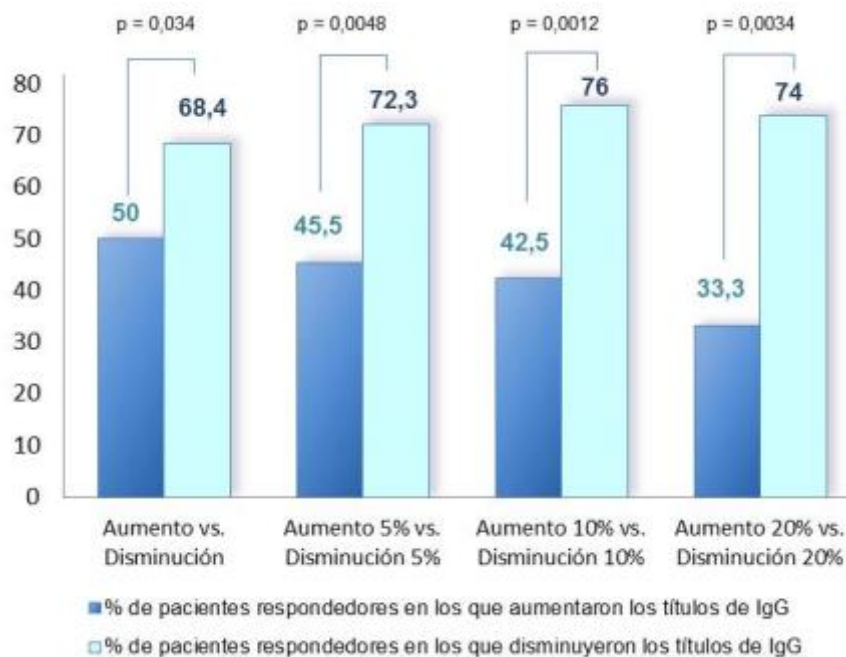


Fig 22. Porcentaje de pacientes respondedores tratados con IFN- β : pacientes respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B.

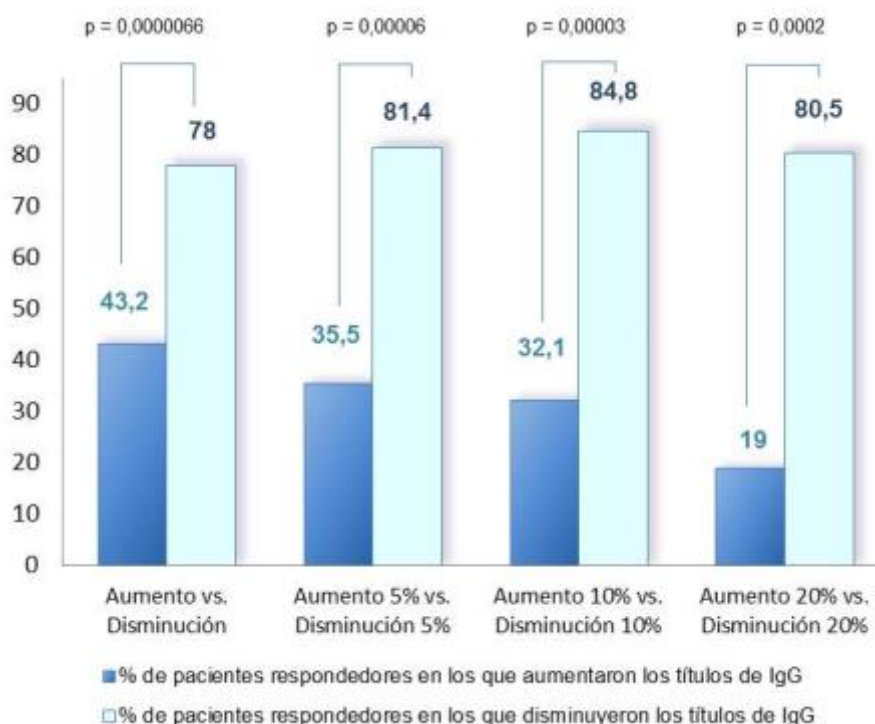


Fig 23. Porcentaje de pacientes respondedores tratados con IFN- β que no desarrollaron NABs: pacientes respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B a lo largo de los dos años de tratamiento.

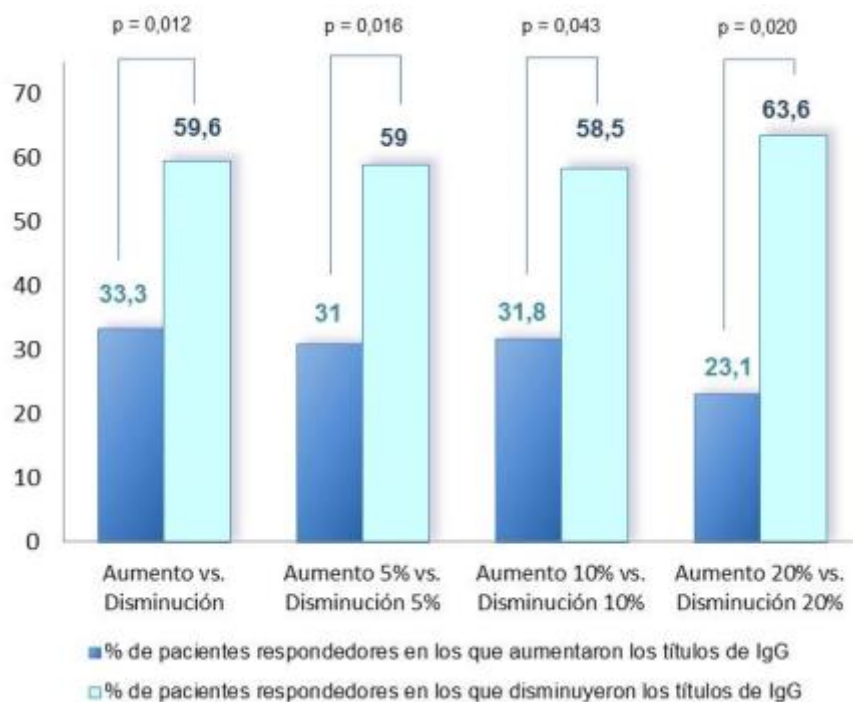


Fig 24. Porcentaje de pacientes respondedores tratados con AG: pacientes respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B a lo largo de los dos años de tratamiento.

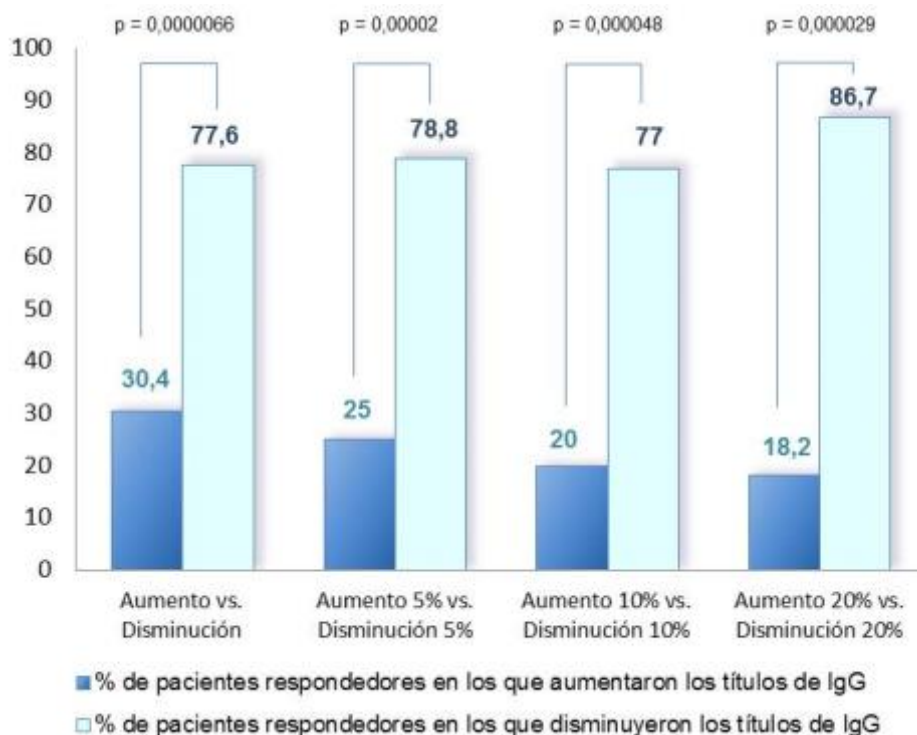


Fig 25. Porcentaje de pacientes respondedores tratados con NTZ: pacientes respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B a lo largo de los dos años de tratamiento.

También se ha encontrado que existe relación entre la no-repuesta clínica (pacientes con al menos dos recaídas y/o un aumento de la puntuación EDSS de 1 punto como mínimo), y el incremento de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B a los dos años (*Figura 26*), ya que cuando los niveles de IgG aumentaron, el porcentaje de pacientes con peor evolución de la enfermedad (31%) fue significativamente mayor ($p = 0.0076$; O.R. = 4.1) que cuando los títulos de anticuerpos disminuyeron (17.2%). Además, de la misma manera que una respuesta clínica favorable se relacionó con una disminución más acusada de los anticuerpos IgG, también se encontraron más pacientes con una progresión más grave de la enfermedad entre los que experimentaron un incremento mayor del 20% de los títulos de anticuerpos (*Figura 27*).

Cuando se evaluaron los tres tratamientos por separado, la tendencia observada fue similar, encontrándose mayor porcentaje de no-respondedores entre los pacientes en los que los títulos de IgG sufrieron un incremento mayor. Cabe destacar, que de nuevo fueron los pacientes tratados con NTZ (*Figura 31*) en los que se encontraron las mayores diferencias entre los grupos estudiados. En cuanto a los pacientes tratados con AG (*Figura 30*), aunque también se encontraron mayor número de no-respondedores cuando los niveles de IgG aumentaron a los 24 meses, no se llegaron a obtener diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de pacientes en los que los títulos de IgG disminuyeron. Por último, en los pacientes tratados con IFN- β (*Figura 28*) los resultados fueron similares a los obtenidos en el grupo de pacientes tratados con NTZ, aumentando significativamente las diferencias en el porcentaje de no-respondedores cuando se consideraron sólo los pacientes que no desarrollaron NAbs a lo largo de los dos años de tratamiento (*Figura 29*).

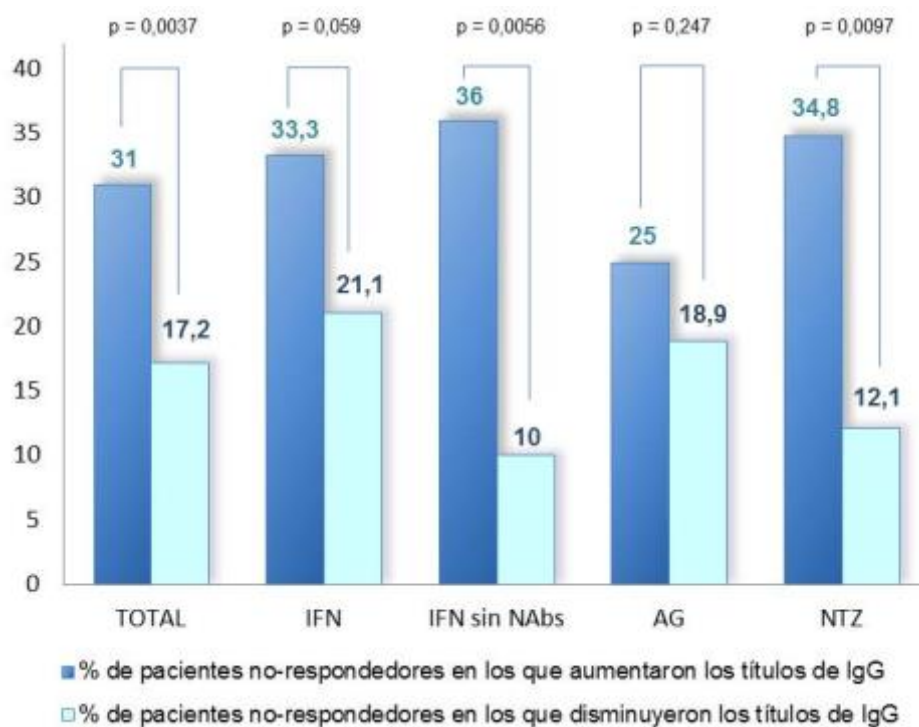


Fig 26. Porcentaje de pacientes no-respondedores: pacientes con EM con al menos dos recaídas y/o un incremento de al menos 1 punto en la puntuación EDSS en función del tratamiento.

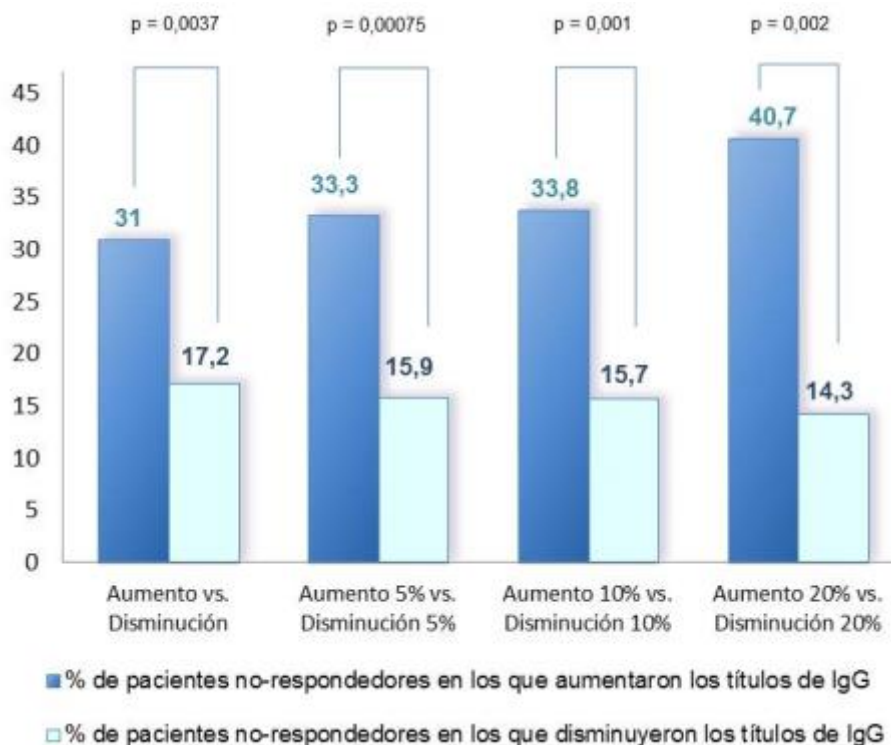


Fig 27. Porcentaje de pacientes no-respondedores: pacientes con EM no-respondedores al tratamiento en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B.

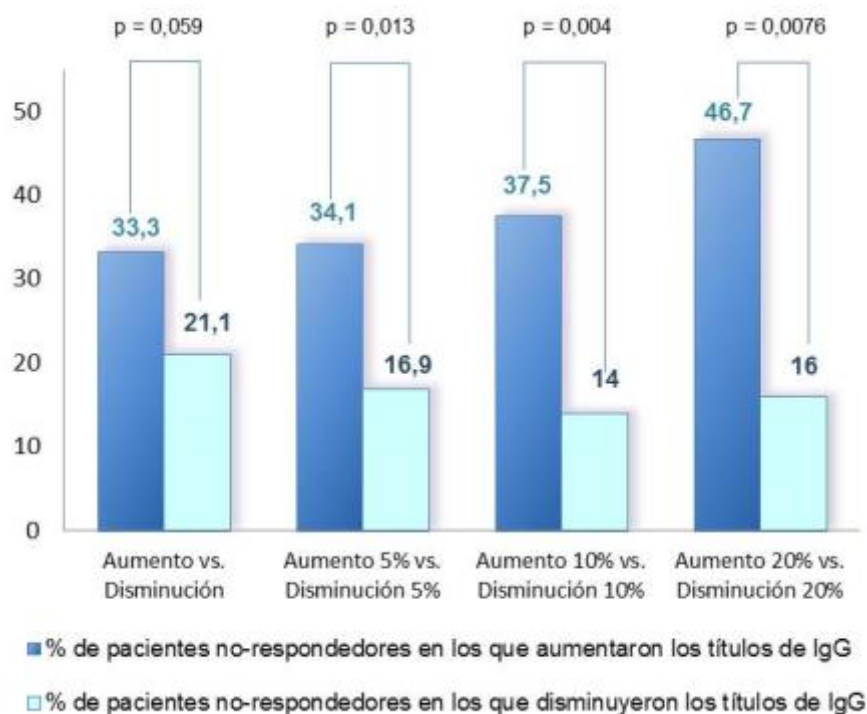


Fig 28. Porcentaje de pacientes no-respondedores tratados con IFN-β: pacientes no-respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B.

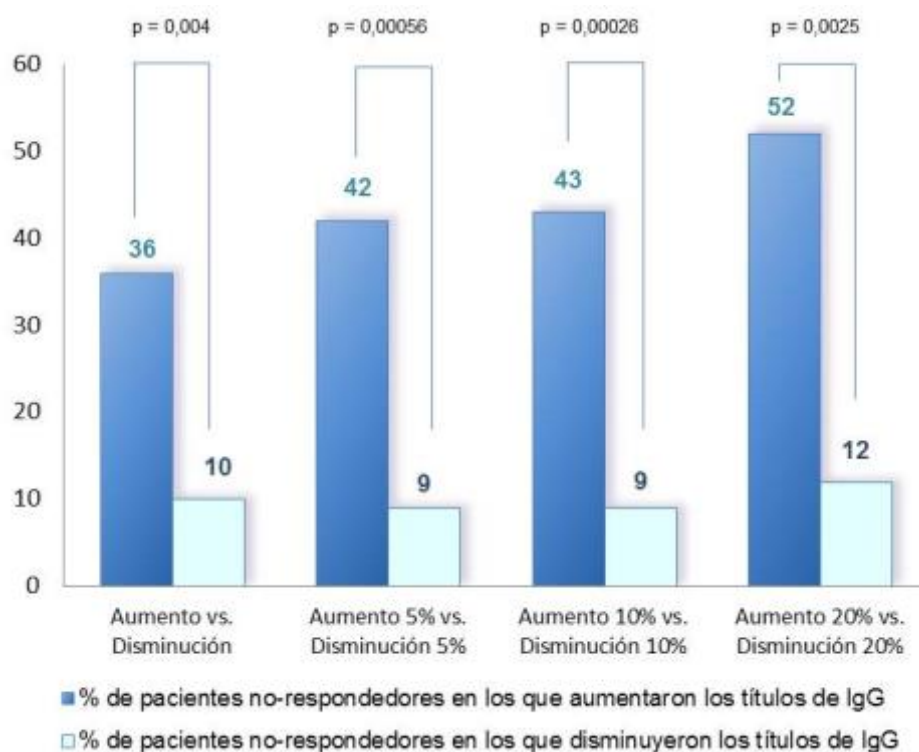


Fig 29. Porcentaje de pacientes no-respondedores tratados con IFN-β que no desarrollaron NAbs: pacientes no-respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B.

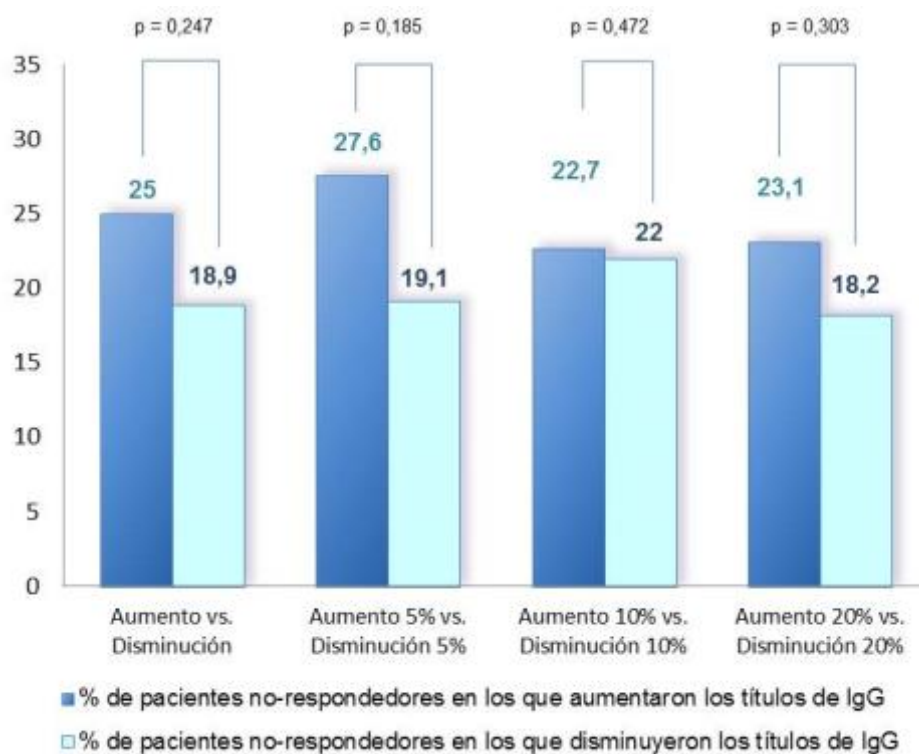


Fig 30. Porcentaje de pacientes no-respondedores tratados con AG: pacientes no-respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B.

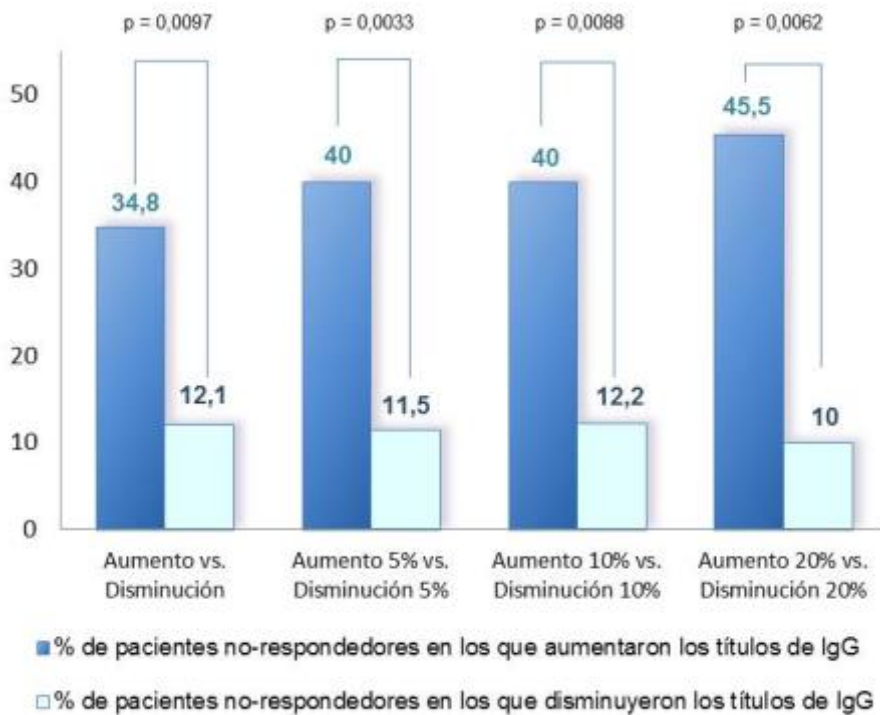


Fig 31. Porcentaje de pacientes no-respondedores tratados con NTZ: pacientes no-respondedores en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B.

3.2. Serología IgM anti-HHV-6A/B y respuesta al tratamiento

La variación de los títulos de IgM anti-HHV-6A/B fue ligeramente superior que la de los títulos de IgG, llegando a variar una media del 35% al completar los dos años de seguimiento. Sin embargo, al relacionarlo con la respuesta clínica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de respondedores cuando los anticuerpos IgM aumentaron o disminuyeron a los 24 meses (*Figura 32*).

Al estudiar los tratamientos por separado, solamente en los pacientes tratados con NTZ, se observó cierta diferencia, ya que se encontraron hasta un 67.2% de respondedores cuando los anticuerpos IgM disminuyeron frente a tan sólo un 55.6% cuando los anticuerpos IgM aumentaron, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($p = 0.089$).



Fig 32. Porcentaje de pacientes respondedores: pacientes con EM respondedores al tratamiento en función del tratamiento.

4. Serología anti-HHV-6A/B y progresión de la enfermedad

Para evaluar la progresión de la enfermedad se utilizó la variación en la puntuación EDSS de disfunción neurológica, observándose que la mayoría de los pacientes en los que se produjo un incremento en dicha puntuación al finalizar el estudio presentaron valores más altos de los títulos de anticuerpos IgG a los dos años (*Figura 33*). Así, cuando los títulos de IgG a los 24 meses alcanzaron niveles por encima de 44 PU, es decir cuatro veces más que el punto de corte que marca la positividad del test (11 PU), la proporción de pacientes libres de progresión fue significativamente menor ($p = 0.0033$) que cuando los títulos de IgG a los 24 meses presentaron valores más bajos, llegándose a encontrar hasta un 75.9% de pacientes libres de progresión cuando los títulos de IgG presentaron valores de 11-22 PU frente a solo un 55% de pacientes sin incremento de la puntuación EDSS cuando $\text{IgG} > 44$ PU.

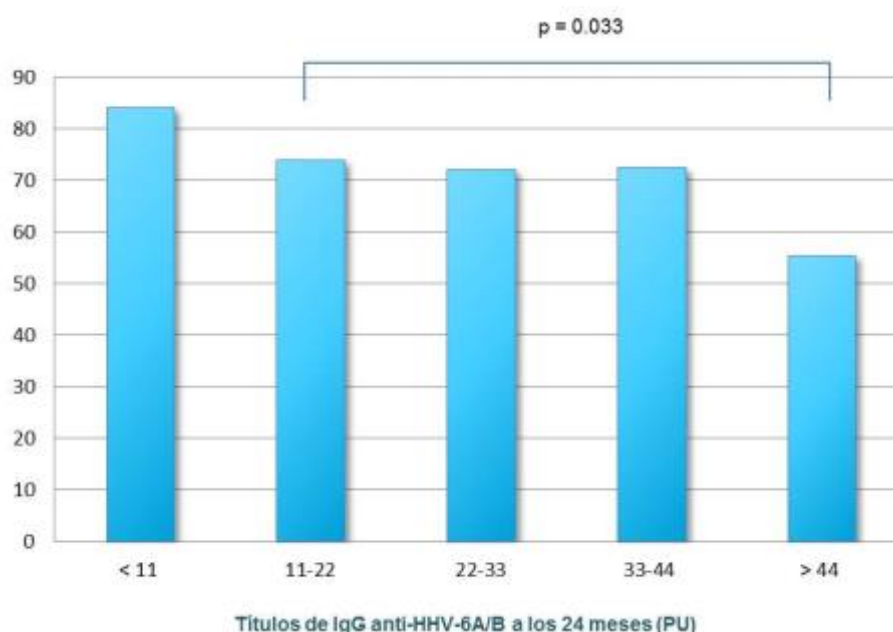


Fig 33. Asociación entre los títulos de IgG anti-HHV-6A/B con la progresión de la enfermedad tras dos años de tratamiento. IgG > 44 PU, 50% (9/18) pacientes libres de progresión; IgG 33-44 PU, 72% (39/54) pacientes libres de progresión; IgG 22-33 PU, 71% (74/104) pacientes libres de progresión; IgG < 22 PU, 75.9 % (82/108) pacientes libres de progresión.

También se encontró asociación entre una mejor evolución de la enfermedad y la disminución de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B durante los dos años de tratamiento. Así, el 81.2% de los pacientes en los que los títulos de anticuerpos disminuyeron, no incrementaron la puntuación EDSS, mientras que sólo el 58.9% de los pacientes mantuvieron o disminuyeron dicha puntuación cuando los anticuerpos IgG aumentaron ($p = 0.00002$; O.R. = 3.1). Al estudiar cada uno de los tratamientos por separado, se observó la misma tendencia (*Figura 34*), encontrándose las mayores diferencias en cuanto al número de pacientes que evolucionaron favorablemente en función de la variación de los títulos de IgG, en los pacientes tratados con NTZ ($p = 0.006$; O.R.= 3.0) y en los pacientes tratados con IFN- β que no desarrollaron NAbs a lo largo del estudio ($p = 0.0005$; O.R. = 6.3).

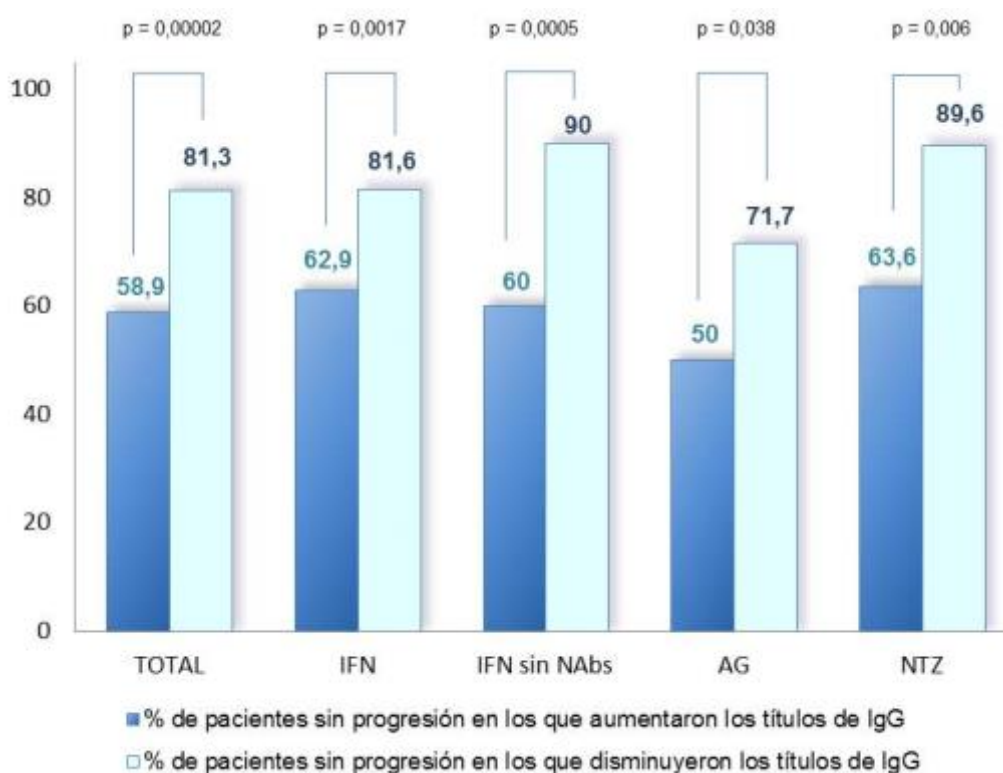


Fig 34. Porcentaje de pacientes sin progresión de la enfermedad: pacientes con EM con evolución favorable en función del tratamiento.

En cuanto a la variación porcentual de los anticuerpos, se encontró un mayor número de pacientes sin progresión de la enfermedad cuanto mayor fue la disminución de los títulos de IgG a los dos años (*Figura 35*), encontrándose hasta un 86.5% de pacientes sin incremento de EDSS entre los pacientes que bajaron los niveles de IgG más de un 20% frente a un 50.9% de pacientes libres de progresión cuando los títulos aumentaron más de un 20% ($p = 0.000012$; O.R. = 3.1).

En cuanto a la serología IgM anti-HHV-6A/B no se encontró asociación con la progresión de la enfermedad.

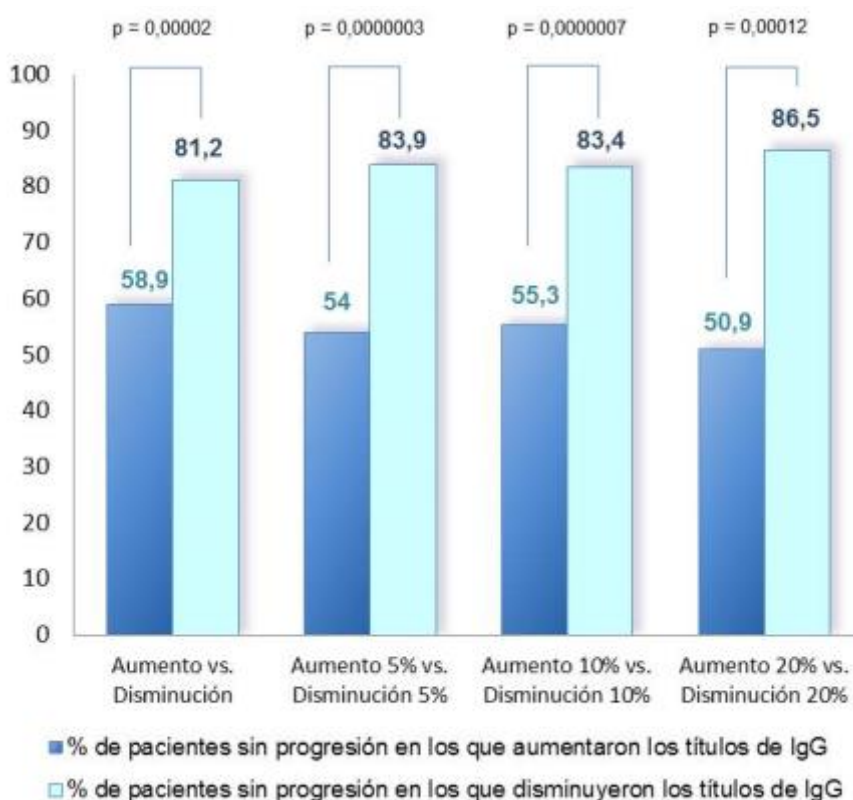


Fig 35. Porcentaje de pacientes sin progresión de la enfermedad: pacientes de EM con evolución favorable en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B.

5. Serología anti-HHV-6A/B y brotes

Cuando se estudió la relación entre la serología anti-HHV-6A/B y la probabilidad de sufrir una recaída durante el tratamiento, sólo se vio asociación con los niveles de anticuerpos IgG (*Figura 36*), encontrándose un mayor riesgo de padecer un brote cuando los títulos de IgG anti-HHV-6A/B eran más altos, ya que sólo el 55% de los pacientes con títulos > 44 PU estuvieron libres de recaídas, mientras que el 82% de los pacientes con títulos de IgG < 11 PU no experimentaron ningún brote durante los dos años de seguimiento ($p = 0.021$).

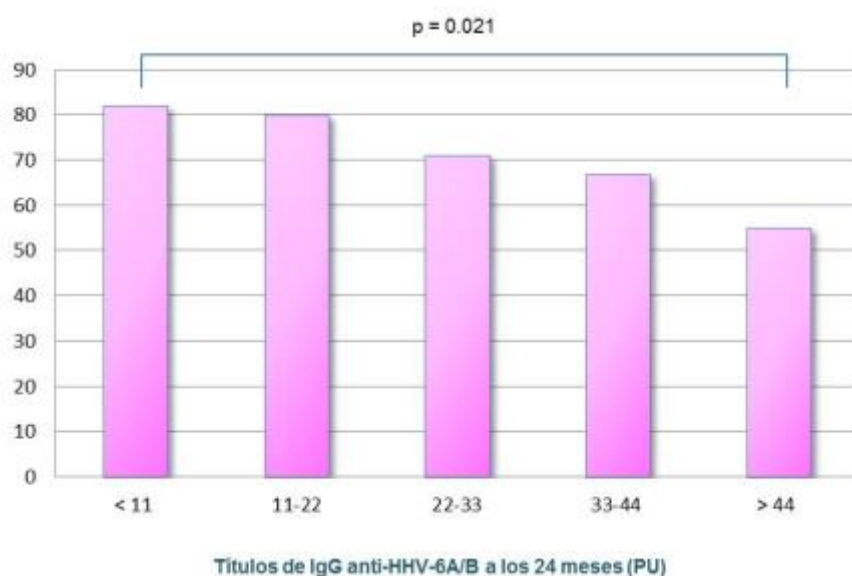


Fig 36. Asociación entre los títulos de IgG anti-HHV-6A/B con la probabilidad de recaídas tras dos años de tratamiento. IgG > 44 PU, 55.5% (10/18) pacientes libres de recaídas; IgG 33-44 PU, 68.5% (37/54) pacientes libres de recaídas; IgG 22-33 PU, 71% (74/104) pacientes libres de recaídas; IgG 11-22 PU, 74.1% (80/108) pacientes libres de recaídas; IgG < 11 PU, 82.3% (14/17) pacientes libres de recaídas.

También se encontró asociación entre la variación de anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B y el riesgo de sufrir una recaída, ya que el 77.5% de los pacientes en los que disminuyeron los anticuerpos IgG no experimentaron brotes a lo largo de los dos años de seguimiento, mientras que sólo el 61.9% de los pacientes en los que aumentaron los anticuerpos IgG estuvieron libres de recaídas ($p = 0.004$; O.R. = 2.0) durante este periodo de tiempo. Al igual que ocurrió con la progresión de la enfermedad, también se encontró asociación entre el porcentaje de disminución de los títulos de IgG y el riesgo de recaídas (*Figura 38*), ya que el número de pacientes que no sufrieron un brote cuando los títulos de IgG disminuyeron más del 20% fue significativamente mayor que cuando los anticuerpos IgG aumentaron más de un 20% ($p = 0.003$; O.R. = 3.1).

Al considerar cada uno de los tratamientos por separado, nuevamente las mayores diferencias se encontraron en los pacientes tratados con NTZ (*Figura 37*), ya que el 77.5% de los pacientes no sufrieron recaídas cuando los anticuerpos IgG disminuyeron a los dos años de seguimiento, mientras que sólo un 47.8% no experimentaron ningún brote cuando los títulos de IgG aumentaron ($p = 0.001$; O.R. = 5.2).

Entre los pacientes tratados con AG no se encontraron diferencias respecto al riesgo de sufrir recaídas cuando los títulos de IgG disminuyeron o aumentaron.

Igualmente, cuando se consideró la población completa de pacientes tratados con IFN- β no se encontraron diferencias en cuanto al riesgo de experimentar un brote entre los pacientes en los que los títulos de IgG aumentaron o disminuyeron. Sin embargo, cuando se tuvieron sólo en cuenta los pacientes que no desarrollaron NAb frente al IFN- β , sí se observaron diferencias respecto al riesgo de sufrir una recaída en función de la variación de los títulos de IgG a lo largo del tratamiento ($p = 0.043$; O.R. = 2.7).

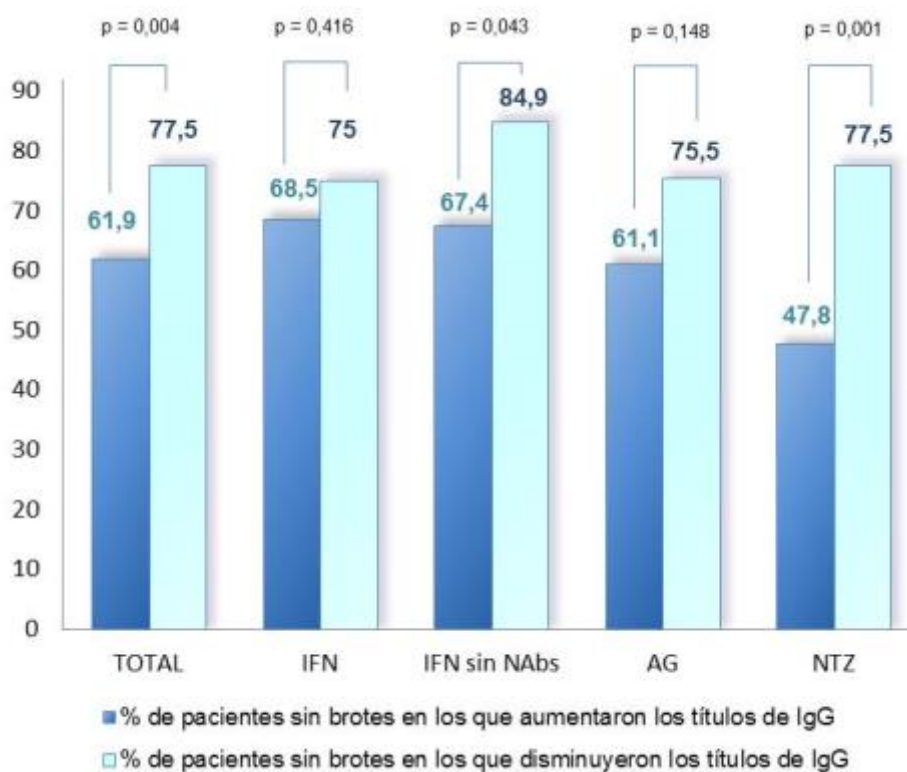


Fig 37. Porcentaje de pacientes con EM sin brotes: pacientes sin recaídas en función del tratamiento.

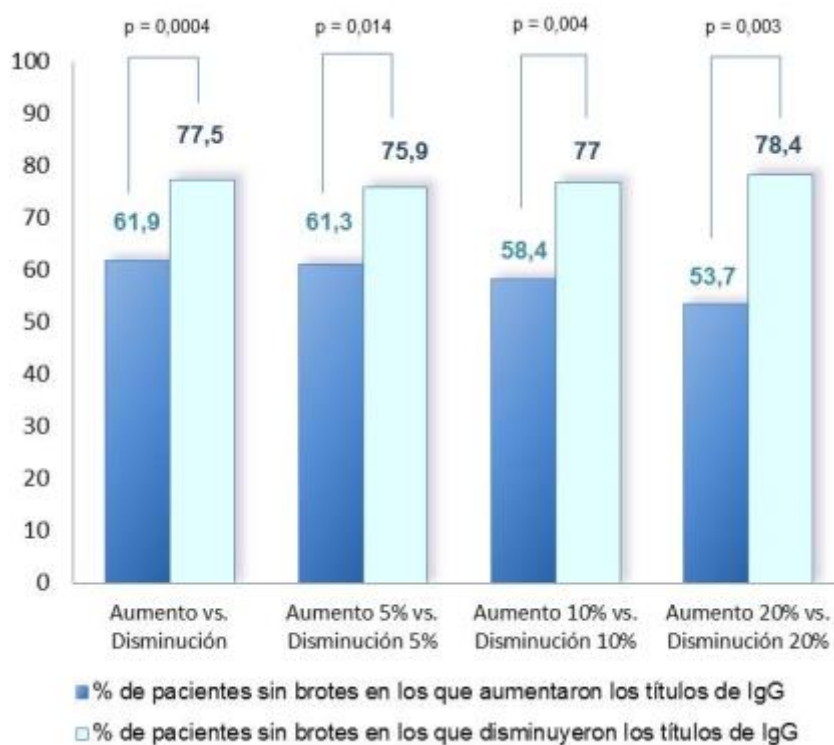


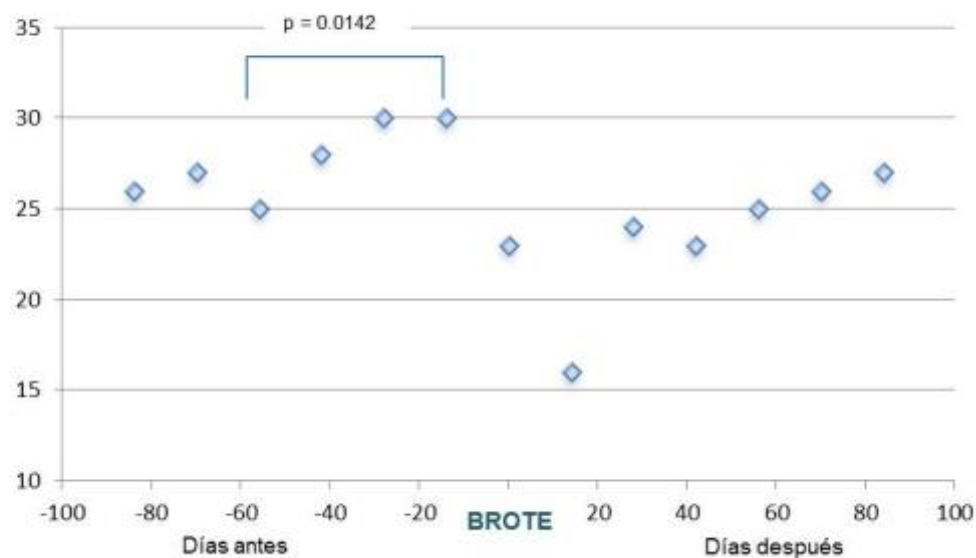
Fig 38. Porcentaje de pacientes con EM sin brotes: pacientes libres de recaídas en función del porcentaje de variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B a lo largo de los dos años de tratamiento.

Para estudiar con más detalle cómo se comportan los anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6A/B en el momento de la recaída, se incluyeron 216 muestras de suero extraídas cuando el paciente sufrió un brote y 278 muestras de suero recogidas hasta tres meses antes y después de la recaída (*Figura 39*).

En relación a los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B, se observó que los títulos comenzaron a aumentar dos meses antes del brote alcanzando su valor más alto dos semanas antes de la recaída ($p = 0.0142$), momento a partir del cual empezaron a disminuir alcanzando su valor mínimo dos semanas después del brote.

En cuanto a los títulos de IgM anti-HHV-6/AB, se observó una tendencia similar, ya que también empezaron a aumentar dos meses antes del brote, aunque en este caso, el valor más elevado para los anticuerpos IgM se alcanzó un mes antes de la recaída ($p = 0.0344$).

Títulos de IgG anti-HHV-6A/B (PU)



Títulos de IgM anti-HHV-6A/B (PU)

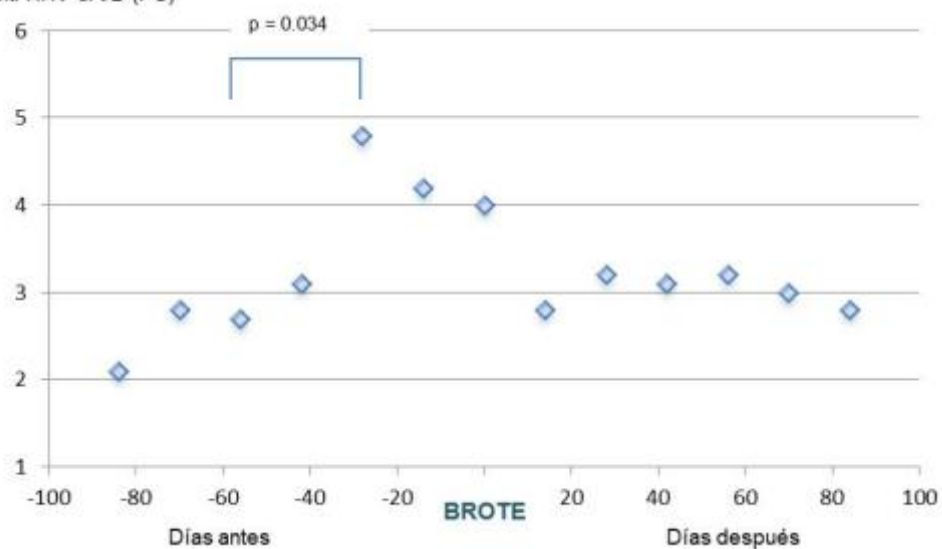


Fig 39. Títulos de IgG e IgM anti-HHV-6A/B en muestras de suero recogidas durante el brote y tres meses antes y después.

6. Análisis de la asociación de las variantes alélicas del HLA-DRB1, HLA-DQA1 y HLA-DQB1 con la serología anti-HHV-6A/B

Sólo se determinó el haplotipo de 245 pacientes de los 301 incluidos en el estudio, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las variables descriptivas que definieron la muestra completa y la submuestra HLA (*Tabla 11*).

	Sexo (Mujer)	Edad al diagnóstico (años)	Edad de inicio del tto (años)	EDSS basal	Número de brotes
Muestra completa	64.7%	30.1 (29.2-31.0)	41.2 (40.2-42.2)	2.4 (2.1-2.6)	0.45 (0.35-0.55)
Submuestra HLA	64.9%	29.6 (28.6-30.6)	41.9 (40.8-42.9)	2.5 (2.2-2.8)	0.49 (0.37-0.60)

Tabla 11. Variables descriptivas de la submuestra HLA para el análisis de relación con la serología anti-HHV-6A/B

La submuestra HLA utilizada en el estudio también es representativa en cuanto a la distribución de haplotipos respecto a la población general, ya que las frecuencias de los alelos HLA-DR encontradas en nuestra población fueron similares a las cifras descritas en poblaciones europeas (*Tabla 12*).

HLA	Muestra del estudio Frecuencia (%)	Población europea Frecuencia (%)
DR1	9.4	11.4
DR2	24.6	16.8
DR3	13.8	13.5
DR4	12.6	16.9
DR5	8.1	9.8
DR6	13.0	12.5
DR7	14.3	14.9
DR8	2.4	2.3
DR9	1.6	0.9
DR10	0.8	0.8

Tabla 12. Distribución de las frecuencias alélicas HLA-DR en nuestra población y en población europea.

Como era de esperar, la baja representación de los alelos HLA-DR8, DR9 y DR10 en la población con un 2.4% (6/245), un 1.6% (3/245) y un 0.8% (2/245) respectivamente, impidieron que se pudiera estudiar la asociación entre los títulos de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6A/B y estos haplotipos.

En la submuestra HLA, el 70% de la población presentó títulos de IgG anti-HHV-6A/B entre 11 y 33 PU. Al estratificar la población por edad, se observó que en los pacientes mayores de 40 años los niveles de IgG fueron más bajos, llegándose a encontrar hasta un 85% de pacientes con títulos de IgG inferiores a 33 PU (*Figura 40*). En cuanto a los valores de IgM anti-HHV-6A/B, el 50% de la población presentó títulos

entre 1.6 (P25) y 5.1 PU (P75). Igualmente, se encontraron valores más bajos en los títulos basales de IgM cuando se tuvo en cuenta sólo la población mayor de 40 años.

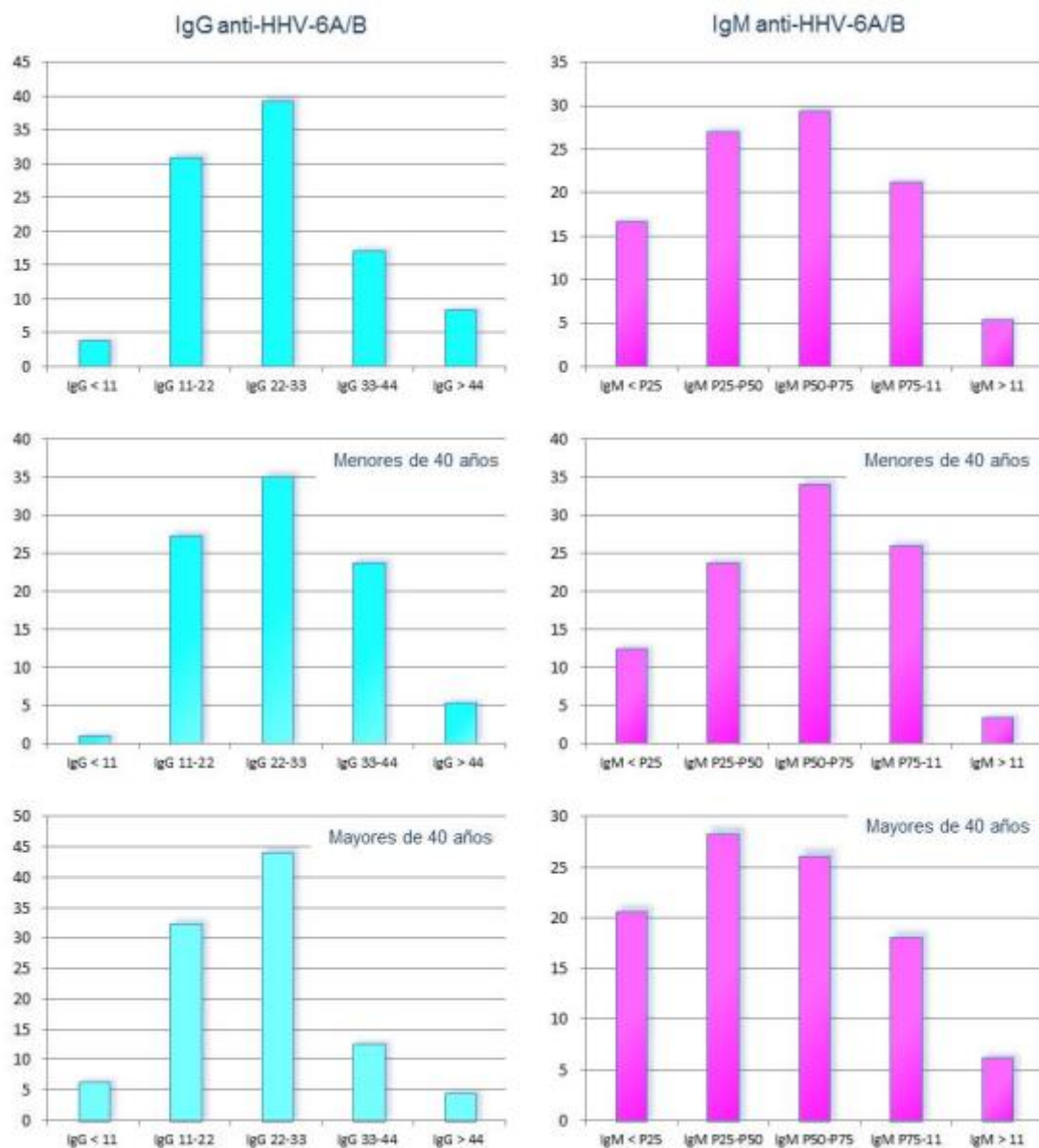


Fig 40. Distribución de los títulos de anticuerpos en la submuestra utilizada para el estudio del haplotipo HLA.

Al estratificar la población en función del haplotipo HLA, se observó aproximadamente la misma proporción de pacientes en función de los valores de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B (*Tabla 13*) e IgM anti-HHV6A/B (*Tabla 14*) para los portadores de los alelos HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5 y HLA-DR7. Sin embargo, en los pacientes con el haplotipo HLA-DR6 se encontraron valores de anticuerpos significativamente más altos que para el resto de la población estudiada (*Figura 41*).

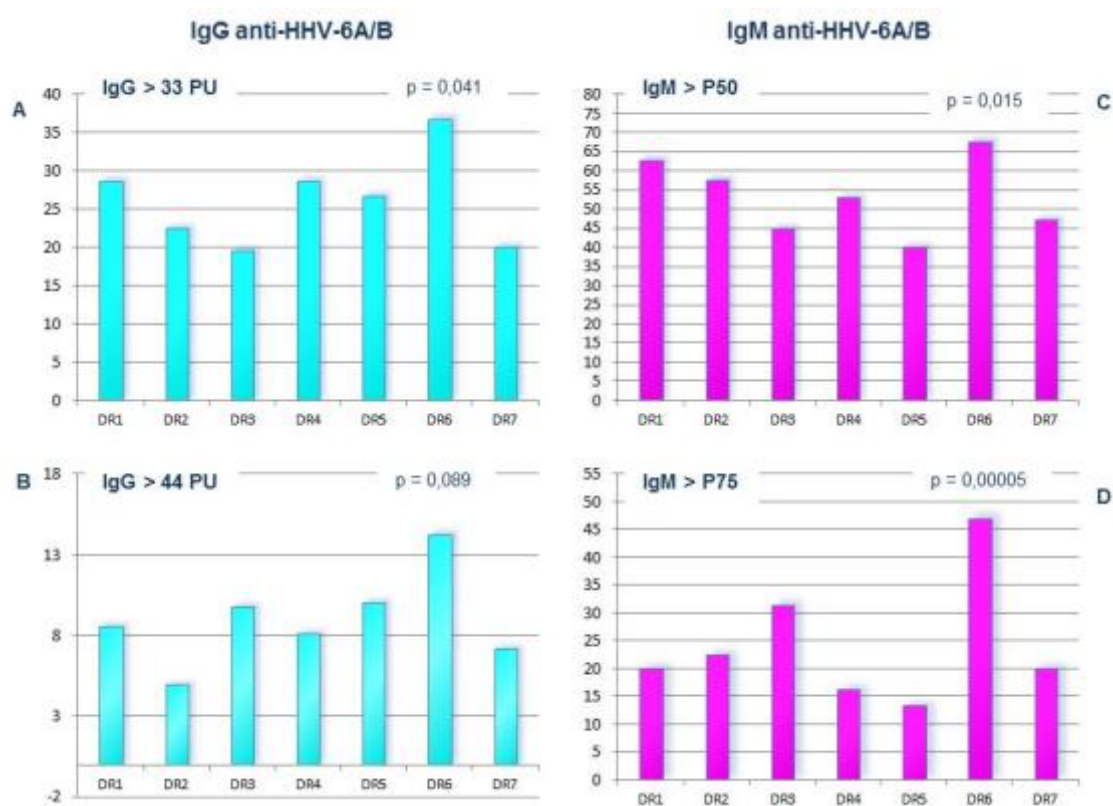


Fig 41. Porcentaje de pacientes en función de los distintos haplotipos HLA estudiados:

- A)** Porcentaje de pacientes con IgG > 33 PU (valor que triplica la positividad del test)
- B)** Porcentaje de pacientes con IgG > 44 PU (valor que cuadruplica la positividad del test)
- C)** Porcentaje de pacientes con IgM > 3.6 PU (P50)
- D)** Porcentaje de pacientes con IgM > 5.1 PU (P75).

Haplotipo	IgG > 33 PU			IgG > 44 PU		
	% Pacientes	p	OR	% Pacientes	p	OR
DR1	28.6% (10/35)	0.660	1.2	8.6% (3/35)	0.963	1.0
DR2	22.5% (9/40)	0.614	0.8	5% (2/40)	0.390	0.5
DR3	19.6% (10/51)	0.256	0.6	9.8% (5/51)	0.670	1.3
DR4	28.6% (14/49)	0.586	1.2	8.1% (4/49)	0.951	0.9
DR5	26.7% (8/30)	0.886	1.1	10% (3/30)	0.728	1.3
DR6	36.7% (18/49)	0.041	2.1	14.2% (7/49)	0.089	2.4
DR7	20% (11/55)	0.264	0.6	7.3% (4/55)	0.730	0.8

Tabla 13. Relación entre los haplotipos HLA y la serología IgG anti-HHV-6A/B

Haplotipo	IgM POSITIVA			IgM > 3.6 PU (P50)			IgM > 5.3 PU(P75)		
	% Pacientes	p	OR	% Pacientes	p	OR	% Pacientes	p	OR
DR1	8.6% (3/35)	0.463	1.6	62.8% (22/35)	0.166	1.7	20% (7/35)	0.442	0.7
DR2	5% (2/40)	0.785	0.8	57.5% (23/40)	0.455	1.3	22.5% (9/40)	0.669	0.8
DR3	5.9% (3/51)	0.992	1.0	45.1% (23/51)	0.240	0.7	31.4% (16/51)	0.234	1.5
DR4	4.1% (2/49)	0.533	0.6	53.1% (26/49)	0.892	1.0	16.3% (8/49)	0.103	0.5
DR5	0% (0/30)	0.137	-	40% (12/30)	0.147	0.6	13.3% (4/30)	0.107	0.4
DR6	18.4% (9/49)	0.000005	11.3	67.3% (33/49)	0.015	2.3	46.9% (23/49)	0.00005	3.4
DR7	1.8% (1/55)	0.132	0.2	47.3% (26/55)	0.390	0.8	20% (11/55)	0.305	0.7

Tabla 14. Relación entre los haplotipos HLA y la serología IgM anti-HHV-6A/B

Los pacientes con haplotipo HLA-DR6 presentaron niveles significativamente más altos de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B que los portadores del resto de haplotipos, ya que el 36.7% (18/49) de los pacientes portadores de este alelo presentaron títulos de anticuerpos basales por encima de 33 PU ($p = 0.041$; O.R. = 2.1), es decir, triplicaban el valor de corte que marca la positividad del test ($\text{IgG} > 11 \text{ PU}$). Sin embargo, las mayores diferencias se observaron en relación a la serología IgM anti-HHV-6A/B (*Figura 42*), ya que de los 12 pacientes de la submuestra HLA que fueron positivos para IgM ($\text{IgM} > 11 \text{ PU}$), 9 de ellos resultaron ser portadores del alelo HLA-DR6 ($p = 0.00002$; O.R. = 11.32).

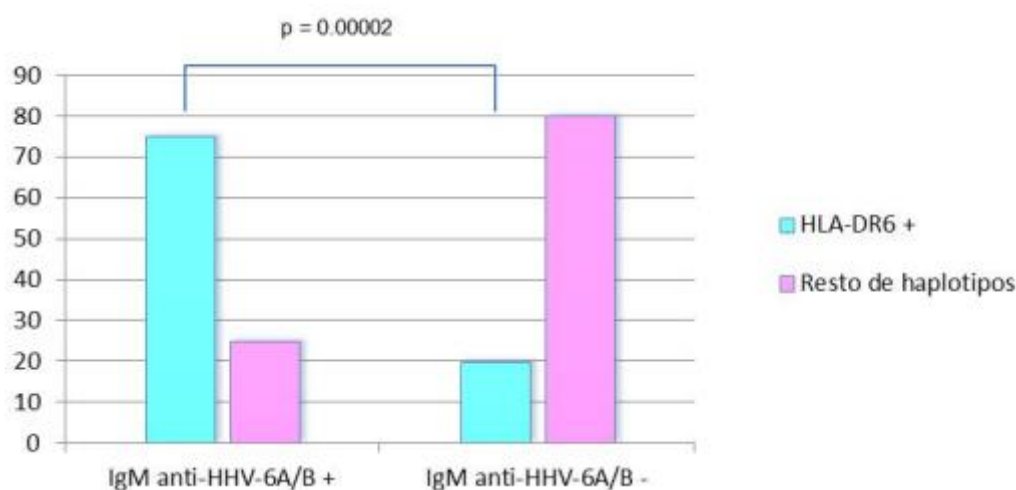


Fig 42. Porcentaje de pacientes IgM anti-HHV-6A/B positivo.

Además, se encontraron niveles de IgM significativamente más altos entre los portadores de este alelo que para el resto de los haplotipos estudiados, encontrándose un 67.3% (33/49) de pacientes portadores de HLA-DR6 con niveles de IgM basales por encima de 3.6 PU, valor correspondiente al P50 ($p = 0.015$; O.R. = 2.3) y un 46.9% (23/49) con niveles de IgM por encima de 5.3 PU, valor correspondiente al P75 ($p = 0.00005$; O.R. = 3.4).

El alelo HLA-DR6 se encuentra en desequilibrio de ligamiento para los alelos 0101, 0102, 0103 y 0501 para HLA-DQA1 y 0503, 0602, 0603 y 0301 respectivamente para HLA-DQB1. Al estudiar la relación entre DQA1 y DQB1 (asociados a DR6) con la positividad para IgM, se ha encontrado que existen diferencias estadísticamente significativas para el haplotipo HLA-DQA1*0101, ya que 5 de los 9 pacientes portadores de HLA-DR6 positivos para IgM presentaron este alelo ($p = 0.006$; O.R. = 1.9).

Por último, debido a que el alelo HLA-DRB1*1501 se ha asociado en múltiples trabajos al riesgo de padecer EM, también se estudió su posible asociación con los niveles basales de IgG e IgM anti-HHV-6A/B, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en los valores de anticuerpos entre los portadores y no portadores de este alelo. A pesar de ello, se encontró un mayor porcentaje de pacientes con haplotipo HLA-DRB1*1501 entre aquellos que presentaron IgM > 11 PU, ya que de los 13 pacientes encontrados con IgM positiva, 8 de ellos eran portadores de este alelo.

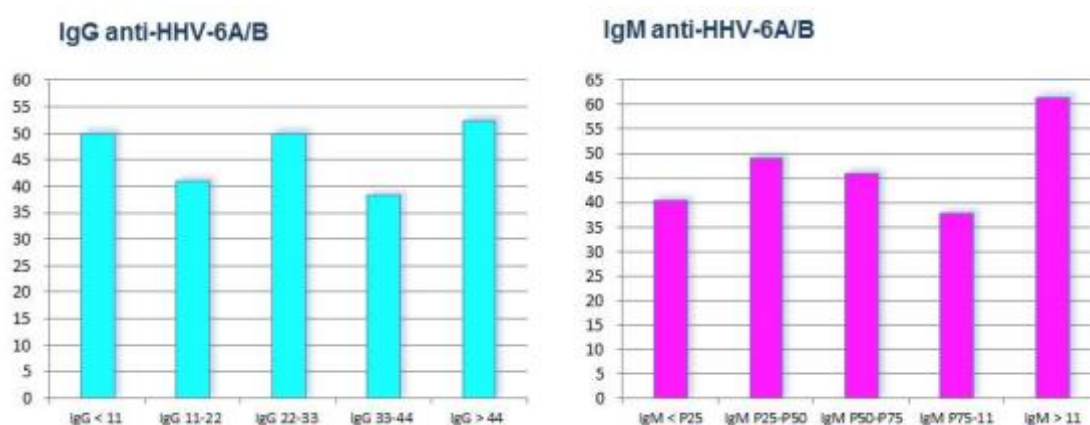


Fig 43. Distribución de los títulos de anticuerpos en los pacientes portadores del alelo HLA-DR1*1501.

7. Análisis de la asociación de los SNPs-GWAS con la serología anti-HHV-6A/B

De los 301 pacientes de EM seleccionados para realizar el estudio serológico frente a HHV-6A/B, solo se realizó la caracterización de los SNPs-GWAS de 186 pacientes, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre la muestra completa y la submuestra de SNPs (*Tabla 18*).

	Sexo (Mujer)	Edad al diagnóstico (años)	Edad de inicio del tto (años)	EDSS basal	Número de brotes
Muestra completa	64.7%	30.1 (29.2-31.0)	41.2 (40.2-42.2)	2.4 (2.1-2.6)	0.45 (0.35-0.55)
Submuestra SNPs-GWAS	64.9%	29.6 (28.6-30.6)	42.0 (40.8-43.1)	2.6 (2.2-2.9)	0.46 (0.32-0.60)

Tabla 18. Variables descriptivas de la submuestra SNPs-GWAS para el análisis de relación con la serología HHV-6A/B.

En los 42 SNPs de los estudios GWAS seleccionados por su relación con la EM, se ha estudiado la asociación entre la presencia del alelo minoritario y la serología IgG e IgM anti-HHV6A/B, así como con su posible implicación en la progresión de la enfermedad y/o en la respuesta clínica al tratamiento. De los 42 SNPs estudiados, el 40.5% (17/42) no se asoció con ninguna de las variables consideradas en este estudio. A continuación, se describen los SNPs más significativos en los que se encontró algún tipo de asociación en relación a las variables estudiadas.

[rs10201872/ T](#)

- *SP140: Regulación del sistema inmune y transcripción*

Se ha encontrado asociación entre el aumento de los títulos de IgG anti-HHV6A/B tras los dos años de seguimiento, tanto en los portadores del alelo minoritario T ($p = 0.039$; O.R. = 1.8), como en los pacientes que presentaron dicho alelo en homocigosis ($p = 0.020$; O.R. = 8.7). En este caso, 5 de los 6 pacientes (83.3%) en los que se encontró el genotipo TT aumentaron los títulos de IgG tras los dos años de tratamiento. Sin embargo, en cuanto a la respuesta clínica, no se ha encontrado asociación entre una evolución menos favorable de los pacientes portadores de este alelo y el resto de la población con EM estudiada.

[rs12368653/ A](#)

- *CYP27B1: Participa en el metabolismo de la vitamina D*

Se han encontrado títulos basales de IgM anti-HHV-6A/B significativamente más altos en los portadores del alelo minoritario A ($p = 0.008$; O.R. = 5.7), encontrándose valores de IgM por encima del percentil 75 en una proporción mayor que para el resto de la población estudiada.

[rs12466022/ A](#)

- *Gen no conocido*

En los portadores del alelo minoritario A, se han encontrado niveles basales de IgG significativamente más bajos ($p = 0.001$; O.R. = 2.6) que en los no portadores de este alelo, ya que en el 47% (40/85) de los pacientes portadores del alelo minoritario A los

niveles basales de IgG estuvieron por debajo de 22 PU, mientras que sólo un 25.7% (35/136) de los pacientes no portadores de este alelo tuvieron títulos de IgG < 22 PU.

rs13333054/ T

- *IRF8: Factor regulador de IFN de tipo I y de genes HLA inducibles por IFN*

Se han encontrado niveles de anticuerpos IgG significativamente más bajos en los portadores del alelo minoritario T ($p = 0.032$; O.R. = 2.7). Los portadores de este alelo también respondieron significativamente mejor al tratamiento ($p = 0.014$; O.R. = 2.0), ya que el 69.4% (59/85) de los pacientes portadores del alelo minoritario T evolucionaron favorablemente tras los dos años de seguimiento. En concreto, fueron los pacientes tratados con IFN- β entre los que se encontraron más respondedores ($p = 0.050$; O.R. = 2.5), ya que de los 38 pacientes portadores del alelo minoritario T tratados con interferones, 28 (73.7%) se encontraron libres de enfermedad a los dos años.

rs201960/ A

- *PVT1: Oncogén relacionado con el factor de transcripción c-myc*

En los portadores del alelo minoritario C, se encontró una peor evolución de la enfermedad, ya que de los 84 pacientes portadores de este alelo, 62 (73.8%) presentaron un aumento de la puntuación EDSS a los dos años de seguimiento ($p = 0.007$; O.R. = 2.2). Al considerar los tratamientos por separado, se observó un aumento significativo de los anticuerpos IgG a los 24 meses en los pacientes tratados con IFN- β ($p = 0.030$; O.R. = 3.1) y con NTZ ($p = 0.041$; O.R. = 3.5) produciéndose un incremento de los títulos de IgG en el 77.8% (21/27) y en el 83.3% (20/24) de los

pacientes portadores del alelo minoritario C tratados con estos fármacos respectivamente.

[rs2243123/ A](#)

- *IL12A: Subunidad necesaria para la inducción de IFN- γ*

Se encontró un aumento de la puntuación EDSS tras los dos años de seguimiento en los pacientes portadores del alelo minoritario C ($p = 0.002$; O.R. = 2.5). Sin embargo, al estudiar cada uno de los tratamientos por separado, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el incremento del EDSS en los pacientes portadores del alelo minoritario C que fueron tratados con AG ($p = 0.004$; O.R. = 4.0).

[rs7200786/ A](#)

- *CLEC16A: Asociada al riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes*

Los anticuerpos anti-HHV-6A/B aumentaron significativamente a lo largo del tratamiento en los pacientes en homocigosis para el alelo minoritario A, tanto los títulos de IgG ($p = 0.011$; O.R. = 2.3) como los de IgM ($p = 0.0005$; O.R. = 3.8), lo que no se tradujo en una peor respuesta a ninguno de los tratamientos estudiados.

[rs7522462/ A](#)

- *KIF21B: Codifica una proteína que participa en el transporte axonal*

Se encontró una peor evolución de los pacientes con el alelo minoritario A en homocigosis, ya que de los 6 pacientes con genotipo AA encontrados, 5 de ellos aumentaron la puntuación EDSS a los dos años ($p = 0.019$; O.R. = 6.2) y no fueron respondedores al tratamiento ($p = 0.034$; O.R. = 7.5).

En cuanto a los portadores de A, los resultados fueron similares, encontrándose una peor evolución de la enfermedad en estos pacientes tanto a nivel de incremento de EDSS ($p = 0.002$; O.R. = 2.6) como a nivel de respuesta al tratamiento ($p = 0.011$; O.R. = 2.0). En concreto, fueron los pacientes portadores de este alelo tratados con IFN- β los que presentaron una peor respuesta clínica ($p = 0.0003$; O.R. = 6.7).

En cuanto a la serología IgG e IgM anti-HHV-6A/B, no se encontró relación con la variación de los anticuerpos a lo largo del tratamiento en los portadores del alelo minoritario A.

[rs79223837/ A](#)

- *HHEX: Participa en la formación de células B y producción de anticuerpos*

Se encontró una disminución significativa de los títulos de IgG en los portadores del alelo minoritario A ($p = 0.049$; O.R. = 1.7). En cuanto a IgM, de los 11 pacientes positivos para IgM encontrados entre los pacientes con EM estudiados, 4 de ellos presentaron genotipo AA en este SNP ($p = 0.015$; O.R. = 4.3). Sin embargo, no se encontró relación con la respuesta al tratamiento ni con la presencia de recaídas a lo largo de los dos años de seguimiento en los portadores del alelo minoritario A.

DISCUSIÓN



1. Serología anti-HHV-6A/B y evolución de la enfermedad

La primera vez que se relacionó el HHV-6 con la EM fue en los años 90, cuando Sola y col.¹¹⁷ encontraron niveles más altos de los títulos de anticuerpos frente a este virus en pacientes con EM que en controles. Sin embargo, la primera evidencia directa de la implicación del HHV-6 con la patogenia de la EM, la obtuvieron Challoner y col.¹¹⁸ cuando, mediante técnicas de inmunocitoquímica, consiguieron demostrar la expresión del virus en los oligodendrocitos de cerebros de pacientes con EM.

A partir de entonces, se han publicado multitud de estudios que pretenden relacionar el HHV-6 con esta enfermedad, algunos asignándole un papel causal y otros proponiéndole simplemente como un factor implicado en la evolución de la enfermedad.

La presencia del HHV-6 en pacientes con EM, tanto dentro del SNC como fuera de él ha sido demostrada en numerosos trabajos¹¹⁹. En concreto, dentro del SNC, utilizando técnicas de PCR in situ¹²⁰ y técnicas de hibridación por inmunofluorescencia (FISH)¹²¹, se ha conseguido demostrar que existen niveles elevados de ADN viral en las zonas de desmielinización del tejido cerebral de pacientes con EM. Fuera del SNC, se ha encontrado el HHV-6 en saliva y sangre en pacientes con EM, aunque también se ha visto en controles sanos, ya que al ser un virus ubicuo asociado a células, es habitual encontrarlo en su forma latente en estos fluidos biológicos¹²². Lo interesante es que en un pequeño porcentaje de pacientes con EM, además de en sangre y saliva, también se ha encontrado ADN viral en orina y suero, lo que indicaría que se está produciendo excreción de partículas del virus debidas a su reactivación, pudiéndose asociar, por tanto, una replicación activa del HHV-6 con la EM^{123,124}. De hecho, se han publicado algunos estudios que relacionan un aumento del ADN viral con la presencia de brotes durante el curso de la enfermedad¹²⁵ y además se ha visto, que en pacientes con EM

en forma de brotes (EM-RR) existe una mayor respuesta inmunológica frente al virus, ya que se han encontrado títulos más altos de anticuerpos IgM frente a antígenos tempranos del HHV-6 (p41/p38) en pacientes con EM-RR que en pacientes con formas progresivas de la enfermedad¹²⁶. Estudios serológicos posteriores demostraron que no solo existían niveles más altos de IgM en los pacientes con EM que en controles, sino que también se encontraron títulos más elevados de IgG anti-HHV-6¹²⁷⁻¹³⁴. En nuestro estudio, también hemos encontrado una mayor prevalencia y unos títulos significativamente más altos de los anticuerpos IgG e IgM anti-HHV6A/B en pacientes con EM que en controles, pero además, los resultados obtenidos en este trabajo, indicarían que la variación de los títulos de IgG a lo largo de la enfermedad podría estar asociada a su evolución, tanto a nivel de progresión como del riesgo de sufrir recaídas, implicando una participación activa de los anticuerpos IgG anti-HHV6A/B en el curso de la enfermedad. Tanto el aumento como la disminución de los títulos de IgG se ha podido asociar con la respuesta al tratamiento, ya que se encontró un mayor número de respondedores cuando los títulos de IgG disminuyeron que cuando los títulos aumentaron. Además, en estos pacientes en los que los títulos de IgG anti-HHV-6A/B se incrementaron se vio una progresión de la enfermedad a pesar de estar siendo sometidos a fármacos para frenarla, pudiéndose llegar a considerar la variación de los anticuerpos IgG como un posible marcador de la respuesta al tratamiento.

La serología anti-HHV-6A/B no sólo se ha conseguido relacionar con la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, sino que además se ha visto que podría predecir las recaídas, ya que se observó un incremento tanto de los títulos de IgG como de IgM antes de producirse un brote. En el caso de los anticuerpos de tipo IgG, el valor máximo de los títulos se alcanzó dos semanas antes de la recaída, mientras que en el caso de los anticuerpos IgM, el valor más elevado se alcanzó un mes antes. La implicación de los anticuerpos de tipo IgG anti-HHV-6A/B en relación a las

recaídas, ya fue observado en 2012 por Simpson *et al.*¹⁴⁷, en un trabajo en el que relacionaban directamente la respuesta inmune frente a los antígenos virales del HHV-6 con el riesgo de sufrir un brote. En cuanto a la serología de tipo IgM, el hecho de que se produzca un incremento de los títulos dos meses antes de que se manifieste un brote, podría indicar que la reactivación del HHV-6 es el principal factor desencadenante del mismo. Sin embargo, a la hora de confirmar el papel causal de este virus como responsable directo de la recaída, hay que tener en cuenta, que en el análisis de los anticuerpos IgM anti-HHV-6A/B llevado a cabo en este estudio (método ELISA de Panbio), existe reactividad cruzada con otros virus como CMV y/o EBV, por lo que su serología también debería ser analizada a la hora de decidir cuál es el agente viral más plausible como el principal causante de la recaída. De hecho, el VEB ha sido contemplado como un posible factor causal de la EM desde los años 80¹⁴⁸, siendo junto al HHV-6A/B, el agente infeccioso que más se ha asociado con la enfermedad en los últimos años¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

1.1. Serología anti-HHV-6A/B y tratamiento con interferones

El papel del virus HHV-6A/B en relación a la respuesta al tratamiento ha sido descrito en varios estudios. En ellos, se encontró ADN viral en el suero de pacientes con EM tratados con IFN- β que no respondían favorablemente al tratamiento¹³⁸, llegándose a proponer incluso que la presencia del ADN de este virus en sangre y suero de los pacientes con EM podría utilizarse como un buen marcador de la no-respuesta al tratamiento con interferones¹³⁵⁻¹³⁷.

El IFN- β es un interferón de tipo I producido de manera fisiológica por los fibroblastos del sistema inmune como respuesta a una infección vírica¹³⁹. El empleo inicial de los interferones en los pacientes con EM se debió a la creencia de que la enfermedad podía estar causada por una infección viral latente en el SNC. Aunque aún no se

conoce el mecanismo por el que se produce una mejoría en los pacientes con EM cuando son tratados con este fármaco, se cree que sus propiedades inmunomoduladoras y antivirales son las responsables de su acción terapéutica sobre esta enfermedad. Entre las múltiples funciones que presenta el IFN- β , en la EM podría actuar inhibiendo la presentación antigénica y la proliferación de células T, aumentando la actividad de las células T supresoras¹⁵², aumentando la síntesis intratecal de IgG a través de un efecto directo sobre las células plasmáticas¹⁵⁹ y promoviendo la supervivencia del astrocito primario mediante el bloqueo de la secreción de IFN- γ ¹⁵³. También se ha demostrado que el IFN- β reduce la expresión de las metaloproteinasas de la matriz extracelular y de moléculas de adhesión que son necesarias en el paso de células T de los vasos a través de la BHE, impidiendo así la extravasación de las dichas células al SNC.

En la actualidad, hay dos tipos de interferones autorizados para el tratamiento de la EM, el IFN β -1a y el IFN β -1b, ambos producidos mediante técnicas de ADN recombinante. Mientras que en la producción de IFN β -1a se emplean células de mamífero, obteniéndose una glicoproteína idéntica a la producida por cultivos de fibroblastos humanos¹⁵², para la producción del IFN β -1b se utilizan bacterias y dado que carecen de las enzimas necesarias para glicosilar las proteínas, el IFN β -1b no tiene azúcares en su estructura. Estas diferencias estructurales modifican la actividad específica del IFN β -1b frente al IFN β -1a, así como su antigenicidad¹⁵⁴.

Al ser proteínas recombinantes, la administración de interferones induce la formación de anticuerpos neutralizantes (NAbs) en una proporción de pacientes que oscila entre un 2 y un 47%^{142,143}. La formación de estos anticuerpos está influida por factores como la antigenicidad intrínseca de la molécula, la formación de agregados, la dosis de antígeno o la vía o frecuencia de administración¹⁵⁵. Los NAbs se asocian a una pérdida

de la eficacia del tratamiento con IFN- β ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, ya que su interacción con el fármaco afecta a su biodisponibilidad reduciendo la dosis efectiva.

En nuestro trabajo, el 32.8% de los pacientes con EM fueron positivos para NAbs al menos en alguna de las cuatro visitas programadas durante los dos años de seguimiento. Debido a esto, a la hora de evaluar la asociación entre la serología IgG e IgM anti-HHV-6A/B y la respuesta al tratamiento con interferones, se ha considerado una cohorte homogénea de pacientes tratados con IFN- β que no desarrollaron NAbs en ningún momento durante el estudio. De hecho, al comparar los resultados obtenidos de la asociación de la serología IgG anti-HHV-6A/B y la respuesta al tratamiento en la población completa de pacientes tratados con interferones y considerando sólo la población que no desarrolló NAbs, la significación estadística fue distinta, encontrándose una mayor asociación entre la respuesta al tratamiento y la variación de los anticuerpos IgG en la población con NAbs negativos ($p = 0.000007$) que en la población completa tratada con interferones ($p = 0.034$). Esta diferencia en la evaluación de la respuesta al tratamiento entre los pacientes que no desarrollaron NAbs y la población completa, también se evidencia a la hora de evaluar la no-respuesta al tratamiento, la progresión de la enfermedad y la ausencia de brotes durante el curso de la misma. Incluso, a la hora de estudiar la no-respuesta al tratamiento, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación al aumento de los títulos de IgG y al número de pacientes no respondedores cuando se consideró la población que no desarrolló NAbs durante el estudio ($p = 0.004$). En general, en nuestro trabajo, en la población con NAbs negativos, se obtuvo aproximadamente un 10% más de pacientes respondedores al tratamiento, con evolución favorable de la enfermedad y ausencia de brotes cuando los títulos de IgG anti-HHV-6A/B disminuyeron que al considerar la población completa tratada con interferones. Esta discrepancia de resultados, parece indicar que para obtener unos datos más exactos y fiables en los estudios de posibles biomarcadores en pacientes

tratados con IFN- β , es necesario considerar el desarrollo de NAbs en el análisis de resultados, ya que la presencia de estos anticuerpos neutralizantes podría resultar un factor de confusión a la hora de evaluar la evolución de los pacientes sometidos al tratamiento con este fármaco.

A pesar de que en nuestro estudio no se encontró una reducción media de las cifras globales de IgG contra el HHV-6, sino únicamente diferentes proporciones de pacientes respondedores según la disminución de los niveles de IgG, existen otros trabajos realizados con el IFN- β en los que sí se han encontrado datos de asociación entre los niveles de IgG anti-HHV-6 y la respuesta a este tratamiento, correlacionándose además con la biodisponibilidad del IFN- β ¹⁶⁰. El mecanismo mediante el cual el IFN- β produce una disminución en los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B podría deberse a su acción antiviral. Este efecto antiviral del fármaco, debería verse reflejado también en la variación de los títulos de IgM anti-HHV6A/B, ya que este tipo de inmunoglobulinas está directamente relacionado con las infecciones activas. De hecho, en nuestro trabajo se encontró una disminución de los títulos de IgM anti-HHV-6A/B, aunque no pudo asociarse con la respuesta al tratamiento. A pesar de ello, existen trabajos que demuestran el efecto antiviral del IFN- β frente al HHV-6, en los que sí se encontró asociación entre la reducción de la replicación del virus, medida mediante PCR y la disminución de la reactividad de IgM contra antígenos virales¹⁶¹.

1.2. *Serología anti-HHV-6A/B y tratamiento con acetato de glatirámero*

El acetato de glatirámero es un polímero de cuatro aminoácidos distribuidos aleatoriamente, que comparte cierta similitud con la MBP¹⁴⁴. Al igual que ocurre con el IFN- β , aún se desconoce el mecanismo exacto por el que produce una mejoría en los pacientes con EM, aunque se han propuesto varias hipótesis. Por un lado, al presentar cierta reactividad cruzada con la MBP, se piensa que podría inhibir la inflamación

asociada a una respuesta inmune frente a la vaina de mielina. Por otro lado, también se ha visto que el AG participa en varios procesos inmunológicos cuya consecuencia es un efecto general de carácter antiinflamatorio: supresión celular, inducción de tolerancia, expansión clonal de células T reguladoras y alteración de las células presentadoras de antígeno¹⁴⁵.

En nuestro estudio, se ha encontrado una asociación significativa entre la reducción de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B y la respuesta clínica a este fármaco. Existen pocos datos publicados acerca de la relación entre el tratamiento con acetato de glatirámico e infecciones virales, ya que el mecanismo de acción de este fármaco no se asocia con un efecto antiviral directo como ocurre con los interferones. Lo más probable es que el hecho de que se produzca un descenso de los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B en los pacientes tratados con AG, no se deba a una reducción directa de la carga viral, sino que pudiera deberse a un efecto indirecto debido a sus acciones antiinflamatorias y reguladoras del sistema inmune. Una hipótesis sobre cómo podría actuar el AG respecto a la producción de anticuerpos IgG frente al HHV-6, podría basarse en la similitud entre la proteína U24 del HHV-6, la MBP y el AG, de forma que este fármaco podría bloquear la unión del virus a las moléculas HLA-II disminuyendo la respuesta humoral frente a él y por tanto reduciendo los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B que podrían estar actuando contra la MBP por reactividad cruzada⁹⁹⁻¹⁰¹.

1.3. *Serología anti-HHV-6A/B y tratamiento con natalizumab*

Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado selectivo del componente de la alfa-4-integrina expresada en la superficie de linfocitos, monocitos y eosinófilos. Estas células utilizan dicha proteína para migrar a través de la BHE mediante su interacción con VCAM-1, molécula expresada en las células del endotelio cerebrovascular inflamado. El mecanismo de acción de NTZ en el tratamiento de la EM, se basa en el

bloqueo de la entrada de leucocitos a través de la BHE mediante su unión a la alfa-4 integrina, impidiendo así que las células inmunes puedan ejercer ningún tipo de acción inflamatoria dentro del SNC¹⁴⁶.

En nuestro estudio, hemos encontrado un descenso significativo de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B asociado fuertemente a una mejor respuesta clínica de los pacientes a los que se administró NTZ. Existen trabajos en los que se ha publicado que el tratamiento con este fármaco produce un descenso significativo de los niveles de IgG e IgM totales en el suero de los pacientes con EM. Estos hallazgos han permitido sostener la hipótesis de que NTZ podría interferir con las células B huéspedes, posiblemente deteniendo la diferenciación de las células B a células plasmáticas interrumpiendo por tanto, la síntesis de inmunoglobulinas¹⁴⁷. Este efecto de NTZ sobre los LBs, podría indicar que el mecanismo por el que se produce una disminución de los títulos de IgG e IgM anti-HHV-6A/B a lo largo del tratamiento con NTZ, podría deberse al bloqueo de la síntesis generalizada de inmunoglobulinas que está llevando a cabo este fármaco.

1.4. Comparación de los tres tratamientos

En nuestro estudio hemos encontrado asociación entre la variación de los títulos de IgG frente al HHV-6 y la respuesta clínica, la progresión de la enfermedad y el riesgo de sufrir recaídas independientemente del tratamiento que se administró a los pacientes.

La mayor asociación se encontró en los pacientes tratados con NTZ, donde se obtuvo una O.R. de 8.0 para una respuesta positiva al tratamiento cuando se produjo una disminución de los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B durante el curso de la enfermedad. También se encontró asociación entre la respuesta clínica y el porcentaje de variación de los anticuerpos IgG, ya que al considerar los pacientes en los que la disminución de

los títulos fue mayor del 20%, la probabilidad de una respuesta favorable aumentó hasta 16 veces (O.R. = 16.1) respecto a los pacientes en los que los títulos aumentaron más de un 20%. Resultados similares se obtuvieron en la población tratada con interferones cuando se evaluaron los datos teniendo en cuenta solo la cohorte de pacientes que no desarrollaron NAb durante el estudio, ya que la probabilidad de una respuesta favorable al tratamiento fue 5 veces mayor (O.R. = 4.9) cuando los anticuerpos IgG disminuyeron que cuando aumentaron, encontrándose de nuevo, una mayor probabilidad de respuesta clínica favorable (hasta 18 veces más) cuando los títulos de IgG disminuyeron más de un 20%.

En el grupo de pacientes tratados con AG, fue donde se encontró una asociación menor, obteniéndose una probabilidad de mejor respuesta al tratamiento sólo 3 veces mayor cuando los anticuerpos disminuyeron que cuando aumentaron.

Las diferencias encontradas en relación a la asociación de la serología anti-HHV-6A/B y la respuesta al tratamiento entre los tres tipos de fármacos considerados en este estudio, podría deberse a su mecanismo de acción. Así, mientras el IFN- β podrían afectar directamente a la respuesta humoral a través de su acción antiviral y NTZ podría disminuir directamente la respuesta de las células B frente al virus bloqueando la síntesis de inmunoglobulinas, el AG, al no tener una acción antiviral, no actuaría directamente sobre la producción de anticuerpos, siendo su efecto respecto a la disminución de los títulos de IgG menos evidente que para los otros dos fármacos.

Mientras que para los tres tratamientos se encontró asociación entre la disminución de los anticuerpos IgG y la progresión de la enfermedad, (IFN- β , $p = 0.0005$; AG, $p = 0.038$; NTZ, $p = 0.006$), en relación a los brotes, no se observó asociación entre la variación de los anticuerpos IgG y las recaídas en los pacientes tratados con AG (IFN- β , $p = 0.043$; AG, $p = 0.148$; NTZ, $p = 0.001$). Este hecho, unido a que el IFN- β y NTZ tienen un efecto directo sobre la respuesta frente al virus, mientras que el AG no

actuaría directamente sobre una posible reactivación viral, parece reforzar la hipótesis actualmente vigente de que el efecto de los virus en la patogenia de la EM podría estar más relacionado con los brotes que con el componente neurodegenerativo de la enfermedad¹⁶²⁻¹⁶⁴.

Cabe destacar la asociación encontrada entre el aumento de anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B y la no-respuesta al tratamiento, ya que en nuestro estudio se encontró mayor número de pacientes con un curso más grave de la enfermedad cuando se incrementaron los títulos de IgG. Este hecho podría indicar un efecto directo de los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B sobre la desmielinización y el daño axonal-neural.

Estos datos también parecen confirmar que tanto el IFN- β como NTZ tienen un efecto directo sobre la síntesis de IgG anti-HHV6A/B, ya que cuando los anticuerpos IgG aumentaron, se observó que el fármaco no estaba ejerciendo su acción de cara a frenar la enfermedad (IFN- β , $p = 0.0056$; NTZ, $p = 0.0097$). Igualmente, queda de manifiesto el efecto indirecto del AG sobre la respuesta inmune asociada a IgG anti-HHV-6A/B, ya que no se encontró asociación entre la no-respuesta al tratamiento con este fármaco y el aumento de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B (AG, $p = 0.247$).

Por último, cabe mencionar, que de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, parece ser que la medida de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B podría ser un buen biomarcador clínico de la respuesta a los diferentes tratamientos. Sin embargo, sin los datos de imágenes de resonancia magnética (MRI), realmente no tenemos un cuadro completo sobre la actividad de la enfermedad y la respuesta terapéutica de los pacientes incluidos en este trabajo, por lo que serían necesarios más estudios longitudinales que incluyan datos de MRI para validar estos resultados.

2. Serología anti-HHV-6A/B y genética

2.1. Serología anti-HHV-6A/B y variantes alélicas HLA

El complejo principal de histocompatibilidad se encuentra en el locus 6p21 del brazo corto del cromosoma 6 y se caracteriza por su alta variabilidad génica¹⁷⁷. En esta región se encuentran los genes HLA de clase I (HLA-A, -B, -C, -E, -F y -G) y los de clase II (HLA-DR, -DQ, -DM y -DP) que participan activamente en la respuesta inmune a través de la presentación antigénica a los linfocitos T, jugando un papel fundamental tanto en la respuesta frente a microorganismos patógenos como en la autoinmunidad¹⁷⁸.

Existen dos vías principales de presentación antigénica. Por un lado, las moléculas HLA de clase I (expresadas en todas las células) estimulan la acción de las células T citotóxicas CD8 y por otro, las moléculas HLA de clase II (expresadas sólo en las células presentadoras de antígenos: APCs) estimulan la activación de linfocitos T CD4 que desencadenan la producción de interleuquinas, interferones y de anticuerpos a través de la activación de las células B.

La EM se considera una enfermedad de etiología genética y ambiental, ya que existen numerosos estudios de agregación familiar que han demostrado la existencia de un componente genético de susceptibilidad¹⁷⁹ y múltiples trabajos epidemiológicos de migración que sostienen que sería imprescindible un factor ambiental para que comience la enfermedad¹⁸⁰.

Hasta la fecha, han sido las infecciones por microorganismos patógenos, fundamentalmente virus, los principales factores ambientales sugeridos como los desencadenantes de la EM. El mecanismo mediante el que se llevaría a cabo la acción de los virus, se basa en que ciertas partículas virales, a través del complejo HLA de clase II que contienen las APCs, pondrían en marcha la respuesta autoinmune

estimulando las células B y/o las células T autorreactivas y produciendo citoquinas pro-inflamatorias.

Así, considerando que los estudios genéticos han propuesto que los alelos HLA-DR y HLA-DQ localizados en la región de clase II del MHC podrían ser los principales factores genéticos de riesgo en la EM, y que los estudios epidemiológicos apuntan a una reactivación viral como el agente ambiental más probable asociado a la enfermedad, podría considerarse la hipótesis de que fuese un virus concreto el que activara la respuesta autoinmune asociada a la EM a través de un determinado haplotipo HLA de clase II.

Existen numerosos trabajos en los que se ha conseguido establecer una asociación entre la evolución de enfermedades infecciosas y la presencia de un determinado haplotipo HLA. Por ejemplo, los alelos HLA de clase II (HLA-DRB1*07, HLA-DQB1*0301 y HLA-DRB1*1101) se han relacionado con la infección por el virus de la hepatitis C y B¹⁸¹ y determinados haplotipos de clase I (HLA-B*27) se han relacionado con el curso de la enfermedad producida por el VIH¹⁸². En el caso de la EM, la reactivación del HHV-6 se ha considerado desde hace años como un posible factor desencadenante de la enfermedad. Se ha propuesto que podría actuar a través del complejo HLA de clase II activando la respuesta autoinmune mediante un mecanismo de mimetismo molecular entre una secuencia aminoacídica de la proteína U24 del virus y la MBP^{183,184}. Hasta la fecha, no se ha conseguido relacionar la respuesta inmune frente al HHV-6 con un haplotipo HLA de clase II concreto, aunque existen estudios in vitro que han propuesto al HLA-DR1 como el responsable de la reactivación viral¹⁸⁴.

En este trabajo se ha estudiado la asociación entre la serología anti-HHV-6A/B y los haplotipos del complejo HLA con el fin de poder establecer si alguno en concreto podría asociarse con la síntesis de inmunoglobulinas producidas como consecuencia

de la reactivación de este virus. Para estudiar dicha asociación, sólo se dispuso de los datos genéticos de 245 pacientes de los 301 incluidos en el estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron extrapolables al no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre la submuestra HLA y la muestra completa.

Se encontraron títulos de anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B con valores comprendidos entre 11 y 33 PU y de IgM anti-HHV6A/B entre 1.6 y 5.3 PU en la mayoría de la población estudiada (entre el 70%-80% de los pacientes) independientemente del haplotipo HLA, excepto en los portadores del alelo HLA-DR6 en los que se encontraron valores significativamente más altos tanto de IgG ($p = 0.041$) como de IgM anti-HHV-6A/B ($p = 0.00005$). De hecho, los pacientes con este haplotipo presentaron una probabilidad 4 veces mayor de tener títulos de IgG por encima de 33 PU (el 37% de los pacientes portadores de HLA-DR6) y de IgM por encima de 5.3 PU (el 47% de los pacientes portadores de HLA-DR6) que los pacientes no portadores.

Cabe destacar que de los 12 pacientes positivos para IgM encontrados en la submuestra HLA, 9 de ellos presentaron haplotipo HLA-DR6, observándose una probabilidad 11 veces mayor de encontrar positividad para IgM (O.R. = 11.3) en los portadores de este alelo. Este tipo de anticuerpos son los primeros que se producen tras la infección viral, por lo que encontrar valores positivos para IgM en el suero de estos pacientes, implicaría una respuesta inmune a una replicación activa del HHV-6A/B, hecho que algunos trabajos relacionan directamente con el riesgo de sufrir un brote¹²⁶. Sin embargo, de los 9 pacientes con HLA-DR6 con IgM positiva encontrados en nuestro estudio, solo 5 de ellos manifestaron brotes a lo largo de los dos años de seguimiento, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas respecto a la tasa de recaídas durante el curso de la enfermedad entre los portadores y no portadores del alelo HLA-DR6 ($p = 0.713$). De momento, no existe ningún trabajo que relacione la presencia de este haplotipo con infecciones por Herpesvirus ni con el riesgo de desarrollar EM y debido a la pequeña cohorte de pacientes incluida en

nuestro trabajo, serán necesarios más estudios para confirmar la posible implicación del haplotipo HLA-DR6 en la reactivación del HHV-6A/B y la EM.

El principal alelo implicado en la EM es el HLA-DRB1*1501, siendo hasta la fecha, el factor genético más fuertemente asociado a esta enfermedad. En este alelo, se ha visto que la presencia del oligonucleótido T en el SNP rs3135388 se asocia con un riesgo mayor (entre 3 y 6 veces) de desarrollar la enfermedad¹⁶⁵. En nuestro estudio, hemos analizado la asociación entre la serología IgG e IgM anti-HHV-6A/B, pero no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos entre los portadores y los no portadores de este alelo, con lo que no hemos podido establecer una relación entre el haplotipo HLA-DRB1*1501, el riesgo de desarrollar la enfermedad y la serología anti-HHV-6A/B. A pesar de no haber encontrado ninguna asociación significativa entre la serología anti-HHV-6A/B y el alelo de susceptibilidad HLA-DRB1*1501, sí se observó un mayor número de portadores de este alelo entre los pacientes positivos para IgM. Esto podría indicar cierta participación del haplotipo HLA-DRB1*1501 en la reactivación del HHV-6A/B, pero debido al reducido número de pacientes encontrados con IgM positiva, los resultados deberían confirmarse con más estudios.

2.2. Serología anti-HHV-6A/B y SNPs-GWAS

Los estudios de asociación mediante barrido genómico (GWAS, *genome wide association studies*) pretenden analizar simultáneamente todo el genoma en busca de loci asociados a la enfermedad. Existe un debate acerca de las herramientas que se utilizan para analizar e interpretar la gran cantidad de datos generados por los GWAS debido al gran número de SNPs genotipados. De manera general se han establecido unos umbrales de significación para llevar a cabo la interpretación de los resultados de

asociación utilizando la *corrección de Bonferroni*, que fija el nivel de significación teniendo en cuenta el número de SNPs genotipados.

En nuestro estudio, para el análisis de los SNPs-GWAS no se dispuso de los datos genéticos de los 301 pacientes que participaron en el estudio, sino sólo de 186, pero igual que ocurrió en el caso del análisis del HLA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la submuestra SNPs-GWAS y la muestra completa.

De los 42 SNPs analizados, se encontró asociación destacable con la serología anti-HHV-6A/B, la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en 9 de ellos.

En 6 SNPs se encontró asociación con la serología anti-HHV-6A/B:

- rs10201872: *gen SP140*
- rs13333054: *gen IRF8*
- rs12368653: *gen CYP27B1*
- rs7200786: *gen CLEC16A*
- rs12466022: *gen no conocido*
- rs79223837: *gen HHEX*

En 4 SNPs se encontró asociación con la evolución de la enfermedad y/o repuesta al tratamiento:

- rs13333054: *gen IRF8*
- rs2243123: *gen IL12A*
- rs2019960: *gen PVT1*
- rs7522462: *gen KIF21B*

En cuanto a la serología anti-HHV-6A/B, se ha encontrado cierta tendencia a la asociación ($p = 0.020$) con los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B en los portadores del alelo minoritario T y los pacientes con genotipo TT en el SNP [rs10201872](#), donde se observó un aumento de los anticuerpos durante el estudio (O.R. = 8.7). Este SNP se encuentra en el gen SP140 que codifica una proteína localizada en el cuerpo nuclear de células inmunes. Esta localización y su expresión diferencial en leucocitos, sugieren que podría estar implicada en la patogénesis de la leucemia promielocítica aguda y en infecciones virales¹⁶⁶. Esto explicaría la asociación encontrada de los portadores del alelo minoritario de este SNP con la variación de los anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B a lo largo de la enfermedad, ya que la proteína SP140 podría estar implicada en la respuesta inmune frente al HHV-6. En cuanto a su relación con la EM múltiple, existen estudios en los que se ha visto que la expresión de esta proteína está asociada al riesgo de desarrollar la enfermedad¹⁶⁷.

También se ha encontrado asociación ($p = 0.008$) con los niveles de IgM en los pacientes portadores de A en el SNP [rs12368653](#) del gen CYP27B1, encontrándose niveles significativamente más altos (IgM > 5.1 PU) en los portadores de este alelo, en los que se encontró una probabilidad 6 veces mayor de tener títulos de IgM (O.R. = 5.7) por encima del P75 que en el resto de la población. El gen CYP27B1 codifica una α -hidroxilasa que cataliza la conversión de la 25-hidroxivitamina D3 en la α -1,25-dihidroxi-vitamina D3 (forma activa de la vitamina D) que juega un papel fundamental en el crecimiento de los huesos y en el metabolismo del calcio. En los últimos años, han aparecido numerosos estudios que además proponen un papel inmunomodulador para esta vitamina^{169,170}, ya que se han encontrado receptores de vitamina D (con función hidroxilasa) en las células inmunitarias. De hecho, además de su conocida participación en el metabolismo del calcio, se han propuesto multitud de funciones relacionadas con el sistema inmune: antiinflamatorias, inmunomoduladoras,

antiinfecciosas, antiproliferativas e incluso se ha demostrado que tiene importantes efectos en el desarrollo y función cerebral. Existen estudios que relacionan los polimorfismos en los SNPs **rs12368653** y **rs2248359** del gen CYP27B1 con el riesgo de desarrollar EM^{168,171}. En nuestro trabajo, hemos encontrado relación entre el **rs12368653** y los niveles de IgM anti-HHV-6A/B, pero no hemos encontrado ningún tipo de asociación entre el SNP **rs2248359** y la serología anti-HHV-6A/B. Como ya se ha mencionado, dentro de las funciones propuestas para la vitamina D, se encontraría una acción antiviral, por lo que la asociación encontrada con la IgM anti-HHV-6A/B podría relacionarse con su participación en la respuesta inmune frente a una posible reactivación de este virus.

Para el SNP **rs12466022** también se ha encontrado asociación entre los niveles de anticuerpos IgG anti-HHV-6A/B en los portadores del alelo minoritario, ya que los niveles fueron significativamente más bajos que para el resto de la población. Sin embargo, a pesar de que el polimorfismo en el SNP **rs12466022** se ha asociado con el riesgo de desarrollar EM, aún no se conoce el gen en el que se encuentra y por lo tanto, aún no se ha podido establecer el significado biológico del polimorfismo en este SNP.

Para el SNP **rs13333054** también se encontró cierta tendencia a la asociación ($p = 0.030$) con la serología IgG anti-HHV-6A/B en los portadores del alelo minoritario T, encontrándose títulos de IgG significativamente más bajos que en los pacientes no portadores de este alelo. Este SNP se encuentra en el gen IRF8 que codifica un factor de respuesta a interferones. El IRF8 participa en la maduración de las células mieloides y ha sido asociado, junto a otros factores de respuesta a interferón como el IRF5 con la actividad de la EM en pacientes tratados con IFN- β ¹⁷². En concreto, IRF5

participa en la producción fisiológica de interferones mediada por virus, y de hecho, se ha relacionado con la replicación del HHV-6 en pacientes tratados con IFN- β . En nuestra población, además de encontrarse asociación entre los polimorfismos del IRF8 y los niveles de IgG anti-HHV6A/B, también se encontrado asociación con la respuesta al tratamiento (O. R. = 2.0), observándose mayor número de respondedores entre los portadores del alelo minoritario T, principalmente entre los pacientes tratados con IFN- β (O. R. = 2.5). Esto permite relacionar directamente la presencia del alelo minoritario T en este SNP con la respuesta inmune frente al HHV-6A/B mediada por interferones a través del IRF8. Aún con todo, las significaciones encontradas no son muy altas, apuntando sólo a cierta tendencia a la asociación, por lo que serían necesarios más estudios para confirmar esta relación. En el caso de que se llegara a confirmar, el análisis de este SNP podría utilizarse de cara a predecir la respuesta clínica en los pacientes tratados con IFN- β .

También se encontró asociación ($p = 0.007$) entre la progresión de la enfermedad y el SNP **rs201960** que se encuentra en el gen PVT1, oncogén relacionado con el factor de transcripción c-myc. Este gen se ha asociado con el linfoma de Hodgkin's¹⁷⁴ y con el EBV, ya que se piensa que este virus podría estar rescatando a las células B de la apoptosis en este tipo de linfoma a través del factor de transcripción c-myc¹⁷⁵. En nuestro estudio, se ha encontrado asociación entre los portadores del alelo minoritario C en el **rs2019960** y el aumento del EDSS, de forma que la peor evolución de estos pacientes podría estar relacionada con una replicación viral del EBV que permanecería activo en las células B gracias a variaciones en el c-myc que le podrían permitir autoperpetuarse.

Relacionado con la progresión de la enfermedad, hemos encontrado asociación en el SNP **rs2243123**, que se encuentra en el gen IL12A. Este gen codifica la IL-12,

citoquina proinflamatoria producida en los macrófagos, monocitos y células presentadoras de antígenos, que entre otras funciones, estimula la producción de IFN- γ , molécula que tiene un efecto tóxico sobre los oligodendrocitos. Los portadores del alelo minoritario C en el SNP [rs2243123](#) manifestaron un aumento del EDSS con una probabilidad 2.5 veces superior (O. R. = 2.5) que los no portadores de este alelo. La probabilidad de evolución desfavorable aumentó hasta 4 veces (O. R. = 4.0) cuando se consideraron sólo los pacientes tratados con AG. El efecto de la IL-12 sobre la producción de IFN- γ (que participa en la supervivencia de los oligodendrocitos) podrían ser el responsable de que las variantes en este SNP afecten a la progresión de la EM.

También se encontró una fuerte asociación ($p = 0.0005$) en los pacientes con genotipo AA en el SNP [rs7200786](#) para el aumento de los niveles de IgM anti-HHV-6A/B, de manera que los pacientes con este genotipo presentaron una probabilidad 4 veces superior (O.R. = 3.8) de aumentar los títulos de IgM que el resto de pacientes estudiados. Este SNP se encuentra en el gen CLEC16A, que se ha relacionado con el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes como diabetes, artritis reumatoide y EM. Se conoce poco acerca de la función de esta proteína, aunque se ha encontrado una alta expresión en linfocitos B, células NK (*natural killer*) y células dendríticas. La asociación de este SNP con el aumento de los niveles de IgM, podría estar relacionada con la respuesta inmune frente a la reactivación del virus HHV-6A/B mediada por este tipo de células.

En cuanto al SNP [rs7522462](#), se ha encontrado asociación con la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en la cohorte analizada en nuestro estudio. Este SNP se encuentra en el gen KIF21B, que codifica una proteína que participa en el transporte axonal y que ha sido relacionada con numerosos desórdenes neurológicos,

incluida la EM¹⁷⁶. La asociación con la progresión de la enfermedad y con la no-respuesta al tratamiento encontrada en los pacientes con genotipo AA para este SNP, con una probabilidad 6-7 veces superior de presentar una peor evolución de la enfermedad, puede ser debida a fallos en el transporte axonal asociados a variantes de esta proteína.

Por último, se encontró cierta tendencia de asociación en el SNP [rs79223837](#) respecto a la positividad de IgM anti-HHV-6A/B en los pacientes con genotipo AA. Este SNP se encuentra en el gen HHEX que participa en la formación de células B y la producción de anticuerpos. Esto supone que el polimorfismo en [rs79223837](#) podría estar implicado en la respuesta inmune frente al HHV-6A/B y la producción de anticuerpos, ya que se ha encontrado que los pacientes con genotipo AA para este SNP tienen una probabilidad 4 veces superior (O.R. = 4.3) de presentar IgM positiva que el resto de la población estudiada.

En caso de confirmarse las asociaciones encontradas, la determinación rutinaria de estos SNPs podría ser de gran utilidad como variables con poder predictivo, siempre teniendo en cuenta que el hallazgo de un resultado positivo para una determinada variante no tiene por qué tener el efecto directo sobre la proteína que codifica el gen donde se encuentra dando lugar a una proteína no funcional, ya que en muchas ocasiones, estos SNPs se localizan en zonas intrónicas y sólo juegan un papel regulador en la transcripción del gen.

Por último, destacar, que a pesar de que en todos los SNPs, las asociaciones encontradas, están en genes relacionados con el sistema inmune, debido a la pequeña cohorte de pacientes de nuestro trabajo, serán necesarios más estudios para validarlas.

CONCLUSIONES



1. A pesar de ser un virus ubicuo, tanto la prevalencia como los títulos basales de IgG e IgM anti-HHV-6A/B son significativamente mayores en pacientes con EM que en la población libre de enfermedad.
2. La variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B se ha asociado a la progresión de la enfermedad, ya que se encontró un número significativamente mayor de pacientes libres de progresión cuando los títulos de IgG disminuyeron. Cuando los títulos de IgG aumentaron, se observó un número significativamente mayor de pacientes en los que la enfermedad progresó a pesar de que todos ellos estaban recibiendo tratamientos modificadores de la enfermedad.
3. La variación de los títulos de IgG anti-HHV6A/B se ha asociado con el riesgo de sufrir brotes a lo largo de la enfermedad, ya que cuando los títulos de IgG disminuyeron, el número de pacientes libres de brotes fue significativamente mayor que cuando los títulos de IgG aumentaron.
4. La variación de los títulos de IgG anti-HHV-6A/B se ha asociado con la respuesta al tratamiento, sobre todo en los pacientes tratados con NTZ, entre los que se encontró el mayor porcentaje de respondedores cuando los títulos de IgG disminuyeron (más del 70%).

5. El seguimiento serológico anti-HHV-6A/B en los pacientes con EM podría ayudar a predecir cuándo un paciente va a experimentar una recaída, ya que los títulos aumentaron progresivamente hasta alcanzar un máximo, dos semanas (IgG) o un mes antes (IgM) de que se produjera un brote.
6. Se ha encontrado una fuerte asociación para la positividad de IgM anti-HHV-6A/B con los portadores del haplotipo HLA-DR6, sugiriendo un posible papel de este alelo en la reactivación del virus.
7. Se ha encontrado una asociación entre la serología anti-HHV-6A/B, la evolución de la EM y/o la respuesta al tratamiento en los portadores del alelo minoritario en 9 de los 42 SNPs-GWAS estudiados. Aunque todos los SNPs en los que se ha encontrado algún tipo de asociación han sido relacionados con mecanismos patogénicos implicados en la EM (sistema inmune, mecanismos degenerativos, mecanismos de daño axonal, metabolismo de la vitamina D...), serían necesarios más estudios para confirmar dicha asociación.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008 Jul 8;71(2):129-135.
2. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120:393-399.
3. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesion of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278-285.
4. Wucherpfenning KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;82:695-705.
5. Munz C, Lunemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 2009;9:246-258.
6. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev immunol* 2005;23:683-747.
7. McQualter JL, Bernad CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem* 2007;100:295-306.
8. Medanal, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001;159: 809-815.

9. Alvarez-Cermeno JC, Villar LM. Multiple sclerosis: Oligoclonal bands-a useful tool to avoid MS misdiagnosis. *Nat Rev Neurol* 2013;9:303-304.
10. O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA *et al*. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* 2005;175:1974-1982.
11. Lublin FD, Reingol SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46:907-911.
12. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ *et al*. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 2014;83:278-286.
13. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502-1517.
14. Gronseth GS, Ashman EJ. Practice parameter: the usefulness of evoked potentials in identifying clinically silent lesions in patients with suspected multiple sclerosis: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology 2000;54:1720-5.
15. Cortese I, McFarland HF. Chapter 65: Multiple Sclerosis. *Clinical Immunology: Principles and Practise* 2008:963-976.

16. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC *et al.* New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-231.
17. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
18. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69:292-302.
19. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFN- β Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1993 Apr;43(4):655-661.
20. Jabobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, *et al.* Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol*. 1996 Mar;39(3):285-294.
21. Randomised doubled-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneuosly in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet*. 1998 Nov 7;(352(9139):1498-1504.

22. Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Crystal H, Drexler E, *et al.* A pilot trial of Cop 1 in exacerbating-relmitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1987 Aug 13;317(7):408-414.

23. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, *et al.* Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-relmitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* 1995 Jul;45(7):1268-1276.

24. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS. European/Canadian multicenter, double-blind randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic reonance imaging—measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann Neurol.* 2001 Mar;49(3):290-297.

25. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownscheidle CM, Murray TJ, *et al.* Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first desmyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med.* 2000 Sep 28;343(13):898-904.

26. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, *et al.* Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 2001 May 19;357(9268):1576-1582.

-
27. Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1971 Aug;1(4):242-248.
 28. Webb C, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. In vivo and in vitro immunological cross-reactions between basic encephalitogen and synthetic basic polypeptides capable of suppressing experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 1973 May;3(5):279-286.
 29. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela Arnon R. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Sep 30; 94(20):10821-10826.
 30. Aharoni R, Teitelbaum D, Arnon R, Sela M. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Jan 19;96(2):634-639.
 31. Arnon R, Aharoni R. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14593-14598.
 32. Neuhaus O, Farina C, Wekerle H, Hohlfeld R. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*. 2001 Mar 27;56(6):702-708.

33. Gran B, Tranquill LR, Chen M, Bielekova B, Zhou W, Dhib-Jalbul S *et al.* Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurology*. 2000 Dec 12;55(11):1704-1714.
34. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavereux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, *et al.* Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1293-1303.
35. Freedman MS, Wolinsky JS, Wamit B, Confavreux C, Comi G, Kappos L *et al.* Teriflunomide added to interferon- β in relapsing multiple sclerosis: a randomized phase II trial. *Neurology*. 2012 Jun 5;78(23):1877-1885.
36. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, *et al.* Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet*. 2008 Oct 25;372(9648):1463-1472.
37. Trial Watch: Phase III success for Biogen's oral multiple sclerosis therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Jun;10(6):404.
38. Kappos L, Bates D, Edan G, Eraksoy M, García-Merino A, Grigoriadis N, *et al.* Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol*. 2011 Aug;10(8):745-758.
39. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, *et al.* Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*. 2012 May 17;366(20):1870-1880.

-
40. Marriott JJ, Miyasaki JM, Gronseth G, O'Connor PW. Evidence Report: The efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2010 May 4;74(18):1463-1470.
41. Goodin DS, Arnason BG, Coyle PK, Frohman EM, Paty DW. The use of mitoxantrone (Novantrone) for the treatment of multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2003 Nov 25;61(10):1332-1338.
42. Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, *et al*. Alemtuzumab more effective than interferon β -1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology*. 2012 Apr 3;78(14):1069-1078.
43. Coles AJ, Compston DAS, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, *et al*. Alemtuzumab vs, interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J med*. 2008 Oct 23;359(17):1786-1801.
44. Wynn D, Kaufman M, Montalban W, Vollemer T, Simon J, Elkins J, *et al*. Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *Lancet Neurol*. 2010 Apr;9(4):381-390.
45. Steinman, L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:510-518.

46. Carson, KR. Focosi D, Major, EO, *et al.* Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol.* 2009;10:816-824.
47. Weinshenker, BG. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin.* 1996; 14:291-308.
48. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand.* 1975 Feb;51(2):110-136.
49. Kurtzke JF. Geography in multiple sclerosis. *J Neurol.* 1977 Apr 28;215(1):1-26.
50. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci.* 2001 Apr;22(2):117-139.
51. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology.* 2008 Jul 8;71(2):129-135.
52. Koch-Henriksen N. The Danish Multiple Sclerosis Registry: a 50-year follow-up. *Mult Scler.* 1999 Aug;5(4):293-296.
53. Svenson LW, Warren S, Warren KG, Metz LM, Patten SB, Schopflocher DP. Prevalence of multiple sclerosis in First Nations people of Alberta. *Can J Neurol Sci.* 2007 May;34(2):175-180.

-
54. Houzen H, Niino M, Hata D, Nakano F, Kiluchi S, Fukazawa T, *et al.* Increasing prevalence and incidence of multiple sclerosis in northern Japan. *Mult Scler.* 2008 Aug;14(7):887-892.
55. Ranzato F, Perini P, Tzintzeva E, Tiberio M, Calabrese M, Ermani M, *et al.* Increasing frequency of multiple sclerosis in Padova, Italy: a 30 year epidemiological survey. *Mult Scler.* 2003 Aug;9(4):387-392.
56. Aladro Y, Alemany MJ, Pérez-Vieitez MC, Amela R, Conde M, Reyes MP, *et al.* Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology.* 2005;24(1-2):70-75.
57. Grimaldi LME, Palmeri B, Salemi G, Giglia G, D'Amelio M, Grimaldi R, *et al.* High prevalence and fast rising incidence of multiple sclerosis in Caltanissetta, Sicily, southern Italy. *Neuroepidemiology.* 2007;28(1):28-32.
58. Nicoletti A, Patti F, Lo Fermo S, Messina S, Bruno E, Quattrocchi G, *et al.* Increasing frequency of multiple sclerosis in Catania, Sicily: a 30-year survey. *Mult Scler.* 2011 Mar;17(3):273-280.
59. Pugliatti M, Solinas G, Sotgiu S, Castiglia P, Rosati G. Multiple sclerosis distribution in northern Sardinia: spatial cluster analysis of prevalence. *Neurology* 2002 Jan 22;58(2):277-282.
60. Grimaldi LM, Salemi G, Grimaldi G, Rizzo A, Marziolo R, Lo Presti C, *et al.* High incidence and increasing prevalence of MS in Enna (Sicily), southern Italy. *Neurology.* 2001 Nov 27;57(10):1891-1893.

61. MSIF. Atlas of MS 2013: Mapping multiple sclerosis around the world.
62. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
63. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010;9:520-532.
64. Simon KC, van der Mei IA, Munger KL, Ponsonby A, Dickinson J, Dwyer T, Sundstrom P, Ascherio A. Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology* 2010;74:1365-1371.
65. Jersild C, Svenjgaard A, Fog T. HLA-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*. 1972 Jun3;1(7762):1240-1241.
66. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, *et al*. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 Aug 11;476(7359):214-219.
67. Field J, Browning SR, Johnson LJ, Danoy P, Varney MD, Tait BD, *et al*. A polymorphism in the HLA-DRB1 gene is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13454.
68. Patsopoulos NA, Bayer Pharma MS Genetics Working Group, Steering Committees of Studies Evaluating IFN β -1a and a CCR1-Antagonist, ANZgene Consortium, GeneMSA, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, *et*

- al.* Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol.* 2011 Dec;70(6):897-912.
69. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, *et al.* Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2013 Nov;45(11):1353-1360.
70. Goris A, Pauwels I, Dubois B. Progress in Multiple Sclerosis Genetics. *Curr Genomics.* 2012 Dec;13(8):646-663.
71. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation and neurodegeneration. *Neuron* 2006;52:61-76.
72. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 1995 Dec;47(4-5):425-448.
73. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain.* 2000 May;123(Pt5):968-974.
74. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1990 Oct;53(10):906-911.
75. Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Munz C, Sriram S, *et al.* Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2006 Oct;5(10):887-894.

76. Gilden DH. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2005 Mar;4(3):195-202.
77. Christensen T. Human herpesviruses in MS. *Int MS J.* 2007 Jun;14(2):41-47.
78. Pierrot-Deseiligny C. Clinical implications of a possible role of vitamin D in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2009 Sep;256(9):1468-1479.
79. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008 Mar;7(3):268-277.
80. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autommun Rev.* 2010 Mar;9(5):A387-394.
81. Giovannoni G, Ebers G. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol.* 2007 Jun;20(3):261-268.
82. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA.* 2006 Dec 20;296(23):2832-2838.
83. Hawkes CH. Are multiple sclerosis patients risk-takers? *QJM.* 2005 Dec;98(12):895-911.
84. Ramagopalan SV, Lee JD, Yee IM, Guimond C, Traboulsee AL, Ebers GC, *et al.* Association of smoking with risk of multiple sclerosis: a population-based study. *J Neurol.* 2013 Jul;260(7):1778-1781.

-
85. Hedstrom AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eru J Epidemiol*. 2013 Oct 22.
86. Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, Simon KC, Munger KL, Huber BT, *et al*. Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008 Nov;14(9):1175-1180.
87. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, *et al*. Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol*. 2007 Jan;88(Pt 1):267-274.
88. Perron H, Germi R, Bernad C, García-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, *et al*. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2012 Mar 30.
89. Giovannoni G. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol* 2007;20:261-268.
90. Ascherio A. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: the role of infection. *Ann Neurol* 2007;61:504-513.
91. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, *et al*. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001 Dec 26;286(24):3083-3088.

92. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol*. 2006 Jun;63(6):839-44.
93. Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Hollsberg P. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2004 Apr;109(4):270-275.
94. Sundstrom P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nystrom L, *et al*. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. 2004 Jun 22;62(12):2277-2282.
95. Wagner HJ, Hennig H, Jabs WJ, Siekhaus A, Wessel K, Wandinger KP. Altered prevalence and reactivity of anti-Epstein-Barr virus antibodies in patients with multiple sclerosis. *Viral Immunol*. 2000;13(4):497-502.
96. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, *et al*. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000 Jul 25;55(2):178-184.
97. Okuno T, Takahashi K, Balanchandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, *et al*. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol*. 1989 Apr;27(4):651-653.
98. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, *et al*. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. 1988 May 14;1(8594):1065-1067.

-
99. Cheng W, Ma Y, Gong F, Hu C, Qian L, Huang Q, et al. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front Biosce* (Landmark Ed). 2012;17::1648-1658.
100. Tejada-Simon MW, Zang YCQ, Hong J, Rivera VM, Zhang Jz. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2003 Feb;53(2):189-197.
101. Tait AR, Straus SK. Phosphorylation of U24 from Human Herpes Virus type 6 (HHV-6) and its potential role in mimicking myelin basic protein (MBP) in multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2008 Aug 6;582(18):2685-2688.
102. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 217-245.
103. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, Insel RA, Dewhurst S. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 1998; 26:132-137.
104. Yao K, Crawford JR, Komaroff AL, Ablashi DV, Jacobson S. Review part 2: Human herpesvirus-6 in central nervous system diseases. *J Med Virol* 2010; 82:1669-1978.
105. Sola P, Merelli E, Marasca R, Poggi M, Luppi M, Montorsi M, Torelli G. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56:917-919.

106. Ablashi D, Agut H, Alvarez-Lafuente R, Clark DA, Dewhurst S, DiLuca D, Flamand L, Frenkel N, Gallo R, Gompels UW, Hollsberg P, Jacobson S, Luppi M, Lusso P, Malnati M, Medveczky P, Mori Y, Pellett PE, Pritchett JC, Yamanishi K, Yoshikawa T. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch Virol*, 2014 May;159(5):863-870.
107. Kong H, Baerbig Q, Duncan L, Shepel N, Mayne M. Human herpesvirus type 6 indirectly enhances oligodendrocyte cell death. *J Neurovirol*. 2003 Oct;9(5):539-550.
108. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010; 363:166.
109. Manolio TA, Pearson TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008; 299(11):1335-1344.
110. Genome.gov (ed.). Genome-Wide Association Studies. National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health.
111. Sidney E. Grossberg, Yoshimi Kawade, Leslie D. Grossberg. The neutralization of Interferons by Antibody III. The constant antibody Bioassay. A highly sensitive quantitative detector of low antibody levels. *J Interferon Cytokine Res*. 2009 Feb; 29(2):93-104.
112. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.

-
113. Goris A, Walton A, Ban M, Dubois B, Compston A, Sawcer S. A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501 allele. *Tissue Antigens* 2008;72:401-403.
114. Zivkovic M, Stankovic A, Dincic E, Popovic M, Popovic S, Raicevic R *et al.* The tag SNP for HLA-DRB1*1501, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: cost-effective high-throughput detection by real-time PCR. *Clin Chim Acta* 2009;406:27-30.
115. Centro Nacional de Genotipado [Internet]. Tecnologías de genotipado. Tecnología iPLEX(R) Gold MassARRAY Sequenom. Available from: www.cegen.org
116. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 Aug 11;476(7659):214-219.
117. Sola P, Merelli E, Marasca R, Poggi M, Luppi M, Montorsi M, Torelli G. Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: survey of anti-HHV-6 antibodies by immunofluorescence analysis and of viral sequences by polymerase chain reaction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56:917-919.
118. Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Sxhultz ER, Bennett JL, Garber RL, Chang M, Schad PA, Stewart PM, Nowinski RC, Brown PB, Burmer GC. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7440-4.

119. Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'ambrosia JM, Ludwin SK, Jacobson S. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis* 2003;187:1377-87.
120. Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM. Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 2003;187:1365-76.
121. Opsahl ML, Kennedy PG. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain* 2005;128:516-27.
122. Akhyani N, Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Eaton JM, McFarland HF, Jacobson S. Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis* 2000;182:1321-5.
123. Alvarez-Lafuente R, Martín-Estefanía C, de Las Heras V, Castrillo C, Picazo JJ, Varela de Seijas E, González RA. Active human herpesvirus 6 infection in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2002;59:929-33.
124. Yao K, Crawford JR, Komaroff AL, Ablashi DV, Jacobson S. Review part 2: Human herpesvirus-6 in central nervous system diseases. *J Med Virol* 2010;82:1669-78.
125. Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, Jacobson S. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple

- sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol* 2002;8:250-6.
126. Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, Patnaik M, Jacobson S. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 1997;3:1394-7.
127. Villoslada P, Juste C, Tintore M, Llorenç V, Codina G, Pozo-Rosich P, Montalban X. The immune response against herpesvirus is more prominent in the early stages of MS. *Neurology* 2003; 60:1944-8.
128. Liedtke W, Maless R, Faustmann PM, Eis-Hübinger AM. Human herpesvirus 6 polymerase chain reaction findings in human immunodeficiency virus associated neurological disease and multiple sclerosis. *J Neurovirol* 1995;1:253-8.
129. Ablashi DV, Lapps W, Kaplan M, Whitman JE, Richert JR, Pearson GR. Human Herpesvirus-6 (HHV-6) infection in multiple sclerosis: a preliminary report. *Mult Scler* 1998;4:490-6.
130. Ablashi DV, Eastman HB, Owen CB, Roman MM, Friedman J, Zabriskie JB, Peterson DL, Pearson GR, Whitman JE. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *J Clin Viro* 2000;16:179-91.

131. Friedman JE, Lyons MJ, Cu G, Ablashi DV, Whitman JE, Edgar M, Koskiniemi M, Vaheri A, Zabriskie JB. The association of the human herpesvirus-6 and MS. *Mult Scler* 1999;5:355-62.
132. Virtanen JO, Färkkilä M, Multanen J, Uotila L, Jääskeläinen AJ, Vaheri A, Koskiniemi M. Evidence for human herpesvirus 6 variant A antibodies in multiple sclerosis: diagnostic and therapeutic implications. *J Neurovirol* 2007;13:347-352.
133. Kuusisto H, Hyöty H, Kares S, Kinnunen E, Elovaara I. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis: a Finnish twin study. *Mult Scler* 2008;14:54-58.
134. Ben-Fredj N, Ben-Selma W, Rotola A, Nefzi F, Benedetti S, Frih-Ayed M, Di Luca D, Aouni M, Caselli E. Prevalence of human herpesvirus U94/REP antibodies and DNA in Tunisian multiple sclerosis patients. *J Neurovirol* 2013;19:42-7.
135. Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Montojo-García M, Arroyo R. Human Herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a one-year follow-up study. *Brain Pathology* 2006;16:20-27.
136. Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R. Beta interferon treatment reduce HHV-6 viral load in multiple sclerosis relapses but not in remission. *Eur Neurol* 2004;52:87-91.
137. García-Montojo M, De Las Heras V, Domínguez-Mozo M, Bartolomé M, García-Martínez MA, *et al.* Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon beta 1b in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 2011;18:1027-1035.

-
138. Hong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zang YC, Zhang JZ. Anti-viral properties of interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2002;8:237-242.
139. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, *et al.* Interferon at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:975-990.
140. Johnson KP. The historical development of interferons as multiple sclerosis therapies. *J Mol Med* 1997;75:89-94.
141. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P, Sölberg Sorensen P. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 2004;251:II15-II24.
142. Hurwitz BJ. Important sources of variability in clinical studies of neutralizing antibodies against interferon beta. *J Neurol Sci* 2008;272:8-19.
143. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, *et al.* Copolymer-1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting trial. The Copolymer-1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1995;45:1268-1276.
144. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74:S25-S30.
145. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha-4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 2005;64:1336-1342.

146. Selter RC, Biberacher V, Grummel V, Buck D, Ejenbröker C, *et al.* Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2013;19:1454-14614.
147. Simpson S Jr, Taylor B, Dwyer DE, Taylor J, Blizzard L, *et al.* Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012;18:799-806.
148. Bray PF, Bloomer LC, Salmon VC, Bagley MH, Larsen PD. Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1983;37:94-96.
149. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, *et al.* Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001 Dec 26;286(24):3083-3088.
150. Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Hollsber P. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2005;109:270-275.
151. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, *et al.* Multiple sclerosis after infection mononucleosis. *Arch Neurol* 2007 Jan;64(1):72-75.
152. Holliday SM, Benfield P. Interferon β -1a. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in multiple sclerosis. *Bio-Drugs* 1997;8:317-30.

153. Barca O, Ferre S, Seoane M, Prieto JM, Lema M, Senaris R, Arce VM. The interferon beta promotes survival in primary astrocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neuroimmunol*. 2003 Jun;139(1-2):155-9.
154. Ross C, Clemmensen KM, Svenson M, Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Skovgaard GL, *et al*. Immunogenicity of interferon β in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol* 200;48:706-12.
155. Canet M. IFN β : Is there a ceiling effect in multiple sclerosis? *Clin Drug Invest* 2001;21:307-18.
156. The IFN β Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. *Neurology* 1996;47:889-894.
157. Francis GS, Rice GP, Alsop JC: Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. *Neurology* 2005;65:48-55.
158. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Bendtzen K: Are ex vivo neutralising antibodies against IFN-beta always detrimental to therapeutic efficacy in multiple sclerosis? *Mult Scler* 2007;13:616-621.

159. Tourtellotte WW, Walsh MJ, Baumhefner RW *et al.* The current status of multiple sclerosis intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. *Ann NY Acad Sci* 1984;436:52-67.
160. García-Montojo M, De Las Heras V, Bartolome M, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R. Interferon beta treatment: bioavailability and antiviral activity in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 2007 Dec;13(6):504-12.
161. Hong J, Tejada-Simon MW, Rivera VM, Zang YCQ, Zang JZ. Anti-viral properties of interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2002 May;8(3):237-42.
162. Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, *et al.* Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol.* 2002 Jun;8(3):250-6.
163. Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch Neurol* 2004 Oct;61(10):1523-7.
164. Alvarez-Lafuente R, de las Heras V, García-Montojo M, Bartolomé M, Arroyo R. Human herpesvirus-6 and multiple sclerosis: relapsing-remitting versus secondary progressive. *Mult Scler.* 2007 Jun;13(5):578-83.
165. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, Raj T; IMSGC; ANZgene, Gourraud PA, Stranger BE, Oksenberg J, Olsson T,

- Taylor BV, Sawcer S, Hafler DA, Carrington M, De Jager PL, de Bakker PI. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet* 2013 Nov;9(11):e1003926.
166. Bloch D.B, de la Monte S. M, Guigoour P, Filippov A. Bloch K.D. Identification and Characterization of a leucocyte-specific component of the nuclear body. *J. Biol Chem* 271:299198-29204(1996).
167. Matesanz F, Potenciano V, Fedetz M, Ramos-Mozo P, Abad-Grau Mdel M, Karaky M, Barrionuevo C, Izquierdo G, Ruiz-Peña JL, García-Sánchez MI, Lucas M, Fernández O, Leyva L, Otaegui D, Muñoz-Culla M, Olascoaga J, Vandenbroeck K, Alloza I, Asotobiza I, Antigüedad A, Villar LM, Alvarez-Cermeño JC, Malhotra S, Comabella M, Montalban X, Saiz A, Blanco Y, Arroyo R, Varadé J, Urcelay E, Alcina A. A functional variant that affects exon-skipping and protein expression of SP140 as genetic mechanism predisposing to multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2015 Oct 1;24(19):5619-27.
168. Zhuang JC, Huang ZY, Zhao GX, Yu H, Li ZX, Wu ZY. Variants of CYP27B1 are associated with both multiple sclerosis and neuromyelitis optica patients in Han Chinese population. *Gene* 2015 Feb 25;557(2):236-9.
169. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain* 2010;133:1869-1888.
170. Ascherio A, Kassnadra L, Munger, Claire Simon K. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010;9:599-612.

171. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J. The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 2009a;8:621-6.
172. Sellebjerg F, Sondergaard HB, Koch-Herilsen N, Sorensen PS, Oturai AB. Prediction of response to interferon therapy in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2004 Oct;130(4):268-75.
173. Vanderbroeck K, Alloza I, Swaminathan B, Antigüedad A, Otaegui D, Olascoaga J, Barcina MG, de las Heras V, Bartolomé M, Fernández-Arquero M, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R, Cénit MC, Urcelay E. Validation of IRF5 as multiple sclerosis risk gene: putative role in interferon beta therapy and human herpes virus-6 infection. *Genes Immuno*. 2011 Jan;12(1):40-5.
174. Enciso-Mora V, Broderick P, Ma Y, Jarrett RF, Hjalgrim H, Hemminki K, van den Berg A, Olver B, Lloyd A, Dobbins SE, Lightfoot T, van Leeuwen FE, Forsti A, Diepstra A, Broeks A, Vijayakrishnan J, Shiel L, Lake A, Montgomery D, Roman E, Engert NS, Glimelius B, Hamilton-Dutoit S, de Bruin M, Ryder LP, Molin D, Sorensen KM, Chang ET, Taylor M, Cooke R, Hofstra R, Westers H, van Wezel T, van Eijk R, Ashworth A, Rostgaard K, Melbye M, Swerdlow AJ, Houlston RS. A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3). *Nat Genet* 2010 Dec;42(12):1126-30.
175. Faumont N, Durand-Panteix S, Schlee M, Grömminger S, Schuhmacher M, Hölzen M, Laux G, Mailhammer R, Rosenwald A, Staudt LM, Bornkamm GW, Feuillard J. C-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems

- activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 2009 May;83(10):5014-27.
176. Muhia M, Thies E, Labonté D, Ghiretti AE, Gromova KV, Xompero F, Lappe-Siefke C, Hermans-Bormeyer I, Kuhl D, Schweizer M, Ohana O, Schwarz JR, Holzbaur EL, Kneussel M. The Kinesin KIF21B Regulates Microtubule Dynamics and Is Essential for Neuronal Morphology, Synapse Function and Learning and Memory. *Cell Rep* 2016 May 3;15(5):968-77.
177. Horton, R., R. Gibson, P. Coggill, M. Miretti, R. J. Alcock, J. Almeida, S. Forbes, J. G. Gilbert, K. Halls, J. L. Harrow, E. Hart, K. Howe, D.K. Jackson, S. Palmer, A. N. Roberts, S. Sims, C. A. Stewart, J. A. Traherne, S. Trevanion, L. Wilming, J. Rogers, P. J. De Jong, J. F. Elliott, S. Sawcer, J. A. Todd, J. Trowsdale, and S. Beck. 2008. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics* 60:1-18.
178. Kelley, J., and J. Trowsdale. 2005. Features of MHC and NK gene clusters. *Transplant Immunol.* 14:129-134.
179. A. D. Sadovnick, G.C Ebers, D. A. Dymment, N. J. Riseh. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group, *Lancet* 347(1996) 1728-1730
180. A. Ascherio, K. L. Munger. Environmental risk factors for multiple sclerosis: Part I.

181. Thursz, M. R., H. C. Thomas, B. M. Greenwood, and A. V. Hill. 1997. Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nat. Genet.* 17:11-12.

182. Wawrzynowicz-Syczewska, M., J.A. Underhill, M. A. Clare, A. Boron-Kaczmarska, I. G. McFarlane, and P T. Donaldson. 2000. HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to alpha-interferon treatment in Poland. *Liver* 20:234-239.

183. Carrington, M., G. W. Nelson, M.P. Martin, T. Kissner, D. Vlahov, J.J. Goedert, R. Kaslow, S. Buchbinder, K. Hoots, and S. J. O'Brien. 1999. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* 283:1747-1752.

184. Hammer J, Takacs B, Sinigaglia F. 1992. Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J. Exp. Med.* 176:1007-1013.

185. Hammer J, *et al.* 1993. Promiscuous and allele-specific anchors in HLADR-binding peptides. *Cell* 74:197-203.

186. Maria-D, Nastke, Aniuska Becerra, Liusong Yin, Omar Dominguez-Amorocho, Laura Gibson, Lawrence J. Stern and J. Mauricio Calvo-Calle. Human CD4_T Cell Reponse to Human Herpesvirus 6. 2012. *Journal of Virology.* 86:9:4776-4792.

ANEXO





Anti-Human Herpesvirus 6A/B IgG Correlates with Relapses and Progression in Multiple Sclerosis

Isabel Ortega-Madueño¹, Marta Garcia-Montojo², Maria Inmaculada Dominguez-Mozo², Angel Garcia-Martinez², Ana Maria Arias-Leal², Ignacio Casanova², Rafael Arroyo^{2,3}, Roberto Alvarez-Lafuente^{2,3*}

¹ Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, ² Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

Abstract

Objective: To analyze the titers of the IgG and IgM antibodies against human herpesvirus 6A/B (HHV-6A/B) in multiple sclerosis (MS) patients treated with different disease modified therapies (DMTs) along two-years of follow-up.

Methods: We collected 2163 serum samples from 596 MS; for 301 MS patients a 2-years follow-up was performed. Serum samples of 337 healthy controls were also analyzed. Anti-HHV-6A/B IgG and IgM were analyzed by ELISA (Panbio).

Results: We found that 129/187 (69.0%) MS patients with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers after 2-years with DMTs were free of relapses and progression vs. 46/113 (40.7%) of MS patients with an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers ($p = 0.0000015$); the higher significance was found for natalizumab. Furthermore, we found that anti-HHV-6A/B IgG titers reached their highest value two weeks before the relapse ($p = 0.0142$), while the anti-HHV-6A/B IgM titers reached their highest value one month before the relapse ($p = 0.0344$).

Conclusion: The measurement of the anti-HHV-6A/B IgG titers could be a good biomarker of clinical response to the different DMTs. The increase of the anti-HHV-6A/B IgG and IgM titers predicts the upcoming clinical relapses. However, further longitudinal studies are needed to validate these results.

Citation: Ortega-Madueño I, Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo MI, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, et al. (2014) Anti-Human Herpesvirus 6A/B IgG Correlates with Relapses and Progression in Multiple Sclerosis. PLoS ONE 9(8): e104836. doi:10.1371/journal.pone.0104836

Editor: Steven Jacobson, National Institutes of Health, United States of America

Received: April 2, 2014; **Accepted:** July 7, 2014; **Published:** August 11, 2014

Copyright: © 2014 Ortega-Madueño et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that, for approved reasons, some access restrictions apply to the data underlying the findings. The data set is not suitable for public deposition as it contains clinical patient information. Requests for the data may be sent to the corresponding author.

Funding: Roberto Alvarez-Lafuente is recipient of a research contract of the Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder) (CP07/00273). Arias-Leal and Garcia-Martinez are recipients of a technician contract from "REEM: Red Española de Esclerosis Múltiple" (RETICS-REEM RD12/0032/0001; www.reem.es). This work was financially supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder) (FIS PI12/02349), "Fundación Mutua Madrileña", and "Fundación LAIR". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Rafael Arroyo and Ignacio Casanova received honoraria for speaking and participating as investigators in clinical trials from Merck-Serono, Teva, Sanofi Aventis, Genzyme, Novartis, Biogen Idec, Bayer and Almirall. Roberto Alvarez-Lafuente received honoraria for speaking from Merck-Serono and Biogen Idec and participating as investigator in studies funded by Merck-Serono, Teva, Sanofi Aventis, Novartis, Biogen Idec and Bayer. Isabel Ortega-Madueño, Marta Garcia-Montojo, Maria Inmaculada Dominguez-Mozo, Angel Garcia-Martinez, and Ana Maria Arias-Leal have nothing to disclose. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: r.alvarezlafuente@yahoo.es

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and degenerative neurological disease in which damage to the central nervous system causes widespread dysfunction [1]. Early in the course of MS, disease modifying therapies (DMTs), such as interferon-beta (IFN-β), glatiramer acetate (GA) or natalizumab reduce the relapse rate and the rate of disability progression [2–4].

There are increasing evidences that a number of environmental factors are important in the development and course of MS. Although no virus or other environmental agents have been definitively implicated as a causative factor of MS, certain human herpesviruses (HHVs) have been linked with the development of MS [5], especially the Epstein-Barr virus (EBV) [6–8], and the formerly known as HHV-6 [9–11]; although some authors have described a

possible relation between HHV-6B and MS [12], it appears that HHV-6A could be mainly associated with MS [13–15]. Different mechanisms have been proposed for these viruses in MS pathogenesis; but, for these viruses or for the other viruses or possible environmental factors that could be involved in MS, a relation with the evolution of the disease and the clinical response to the different DMTs should be demonstrated. Thus, the aim of this study was to analyze the titers of the IgG and IgM antibodies against HHV-6A/B in MS patients treated with different DMTs along two-years of follow-up.

Materials and Methods

Subjects

We collected 2163 serum samples from 596 MS patients in a prospective study (see Table 1). For 301 MS patients a 2-years

Table 1. Clinical and demographic characteristics of the samples and subjects included in the study.

Serum samples of MS patients	2163
In relapse (prior intravenous corticosteroids)	216
In remission	1947
Within the three months before and after a relapse	278
% Serum samples collected without treatment	24.7
% Serum samples collected during interferon beta treatment	27.7
% Serum samples collected during glatiramer acetate treatment	24.3
% Serum samples collected during natalizumab treatment	23.3
MS patients	596
Females	384
Males	212
MS patients with at least two-years of follow-up*	301
Relapsing-remitting MS patients	279
Naïve patients	148
Secondary progressive MS patients	22
Age at the beginning of the study (years)	36.4
Duration of the disease (years)	7.0
Starting age of the disease (years)	29.4
EDSS at the recruitment**	2.4
MSSS at the recruitment**	4.0
Number of relapses two years before starting the treatment	2.3
MS patients treated with interferon beta	131
MS patients treated with glatiramer acetate	89
MS patients treated with natalizumab	81
MS patients with one-year of follow-up	112
MS patients with less than one-year of follow-up	127
Discontinuations before completing 2-years of follow-up***	56
Healthy controls	337
Serum samples of healthy controls	337
Sex	
Females	192
Males	169
Age at the recruitment	37.6

*At least two-years of follow-up with the same disease modifying therapy (DMT) from a base line visit (serum sample extracted before starting the DMT) to a 24 months visit.

**EDSS: Expanded Disability Status Scale. MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score.

***It was included: adverse events, pregnancy, drug withdrawal for lack of efficacy, and patient decision.

doi:10.1371/journal.pone.0104836.t001

longitudinal study was performed: a serum sample was collected prior the beginning of a DMT, and each three months (MS patients treated with natalizumab) or six months (MS patients treated with IFN-beta or GA) to complete, at least, two-years of follow up; a serum sample was also collected when the patient suffered a relapse (prior intravenous corticosteroids). Serum samples of 337 healthy controls were also included in the study. For MS patients we collected the following clinical data: the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score prior the beginning of the DMT and two years later, and the number of relapses along the two-years of follow-up with the different DMTs.

Ethics Statement

This study was approved by our local Ethic Committee ("Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos"), and all the participants received and signed the written informed consent before the enrolment.

Samples

One dry tube with blood was collected for each patient in each one of the visits. After collection of the whole blood, we allowed the blood to clot by leaving it undisturbed at room temperature along 30 minutes; then, we removed the clot by centrifuging at $1,500 \times g$ for 10 minutes in a refrigerated centrifuge. Finally, the serum samples were aliquoted in 0.2 ml tubes, and the aliquots were frozen at -80°C during 32.6 ± 14.1 before being analyzed (the mean time needed to complete one plate).

Anti-HHV-6A/B IgG and IgM ELISA

Every serum sample was tested with two tests of Panbio (Inverness, Australia), for the detection of anti-HHV-6A/B IgG and IgM following the manufacturer instructions. In brief, serum antibodies of the IgG or IgM class, when present, combined with an HHV-6 antigen that was attached to the polystyrene surface of the microwells. Residual serum was removed by washing and peroxidase conjugated anti-human IgG or IgM was added. The microwells were washed and a colorless substrate system, tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide (TMB/H₂O₂) was added. The substrate was hydrolyzed by the enzyme and the chromogen changed to a blue color. After stopping the reaction with acid, the TMB became yellow. The color intensity was directly related to the concentration of HHV-6 IgG or IgM antibodies in the test sample. Results were expressed in Panbio units (PU); they were calculated by multiplying the index value by 10 (the index value for each one of the samples = sample absorbance/cut-off value). Samples were analyzed in duplicate for each test, and doubtful samples, those that were between 9 and 11 Panbio units (PU) were tested again: a total of 60 serum samples (49 from MS patients and 11 from healthy controls) had titers between 9–11 PU; 3 of them (that belonged to 3 MS patients) were considered positive after the new analysis: one of them had a titer value of 10.8 PU and other two samples had 10.7 PU; after the new analysis, the samples had titers of 11.1 PU, 11.1 PU and 11.2 PU, respectively (the variation inter-assays was under 5%). The other doubtful serum samples were considered as negative.

Detection of neutralizing antibodies (NABs) against IFN-beta

NABs were measured in the serum samples of those MS patients treated with IFN-beta through the cytopathic effect (CPE) assay at 6, 12, 18 and 24 months after starting the treatment, as it has been previously described [16]. The titers were calculated according to Kawade's formula [17], and expressed in tenfold reduction unit (TRU). Samples were considered positives if titers were > 20 TRU/ml.

Statistical analysis

Odds ratios (O.R.) and exact 95 percent confidence intervals (C.I.) were calculated with standard microcomputer software: Epi Info v. 6.02 (CDC, Atlanta, USA) and SPSS Ver. 15.0 (SPSS Inc.). The chi-square or two-tailed Fisher's exact test was used to test differences in categorical variables. Kruskal-Wallis analysis or the Wilcoxon rank-sum test was used to test differences in continuous variables. We considered statistically significant differences when $p < 0.05$.

Table 2. Prevalences and mean titers of the anti-HHV-6A/B IgG and IgM antibodies before and after 2-years of treatment with the different DMTs.

Anti-HHV-6A/B IgG						
Prevalences				Mean Titers (PU)		
DMTs	Before	2-years	p	Before	2-years	p
TOTAL	98.0% (295/301)	97.0% (292/301)	0.433	26.8	25.3	0.044
IFN-beta	96.9% (127/131)	96.9% (127/131)	1	24.3	24.1	0.439
GA	98.9% (88/89)	96.6% (86/89)	0.312	30.0	27.9	0.105
NTZ	97.5% (79/81)	97.5% (79/81)	1	27.4	24.3	0.033
Anti-HHV-6A/B IgM						
Prevalences				Mean Titers (PU)		
DMTs	Before	2-years	p	Before	2-years	p
TOTAL	8.3% (25/301)	5.3% (16/301)	0.145	4.4	3.6	0.003
IFN-beta	6.1% (8/131)	6.1% (8/131)	1	4.1	3.5	0.057
GA	11.2% (10/89)	6.7% (6/89)	0.295	4.8	4.2	0.136
NTZ	8.6% (7/81)	2.5% (2/81)	0.086	4.5	3.1	0.024

TOTAL: prevalence and mean titers of all the different disease modifying therapies (DMTs); IFN-beta: interferon beta; GA: glatiramer acetate; NTZ: natalizumab.
doi:10.1371/journal.pone.0104836.t002

Results

Serology of HHV-6A/B in serum samples of MS patients and healthy controls

When we analyzed only those serum samples collected when MS patients were untreated (Table 2), we found that the anti-HHV-6A/B IgG prevalence was 98.0% (295/301) vs. 93.4% (315/337) in healthy controls ($p = 0.005$), and the mean titer was 26.8 PU vs. 23.1 PU in healthy controls ($p = 0.00002$). Regarding anti-HHV-6A/B IgM antibodies, the prevalence was 8.3% (25/301) vs. 5.6% (19/337) in healthy controls ($p = 0.184$) and the mean titer was 4.4 PU vs. 4.0 PU in healthy controls ($p = 0.100$).

Serology of HHV-6A/B and DMTs in MS patients

As can be seen in Table 2, we found a statistical significant reduction of the anti-HHV-6A/B IgG titers after 2-years with the different DMTs ($p = 0.044$), and above all, with natalizumab (0.033). When we analyzed the anti-HHV-6A/B IgM antibodies (Table 2), we found a trend for the reduction of the prevalence in MS patients treated with natalizumab, and a decrease of the mean titers with the different DMTs ($p = 0.003$); again, the greatest reduction was for natalizumab ($p = 0.024$).

Serology of HHV-6A/B and clinical response to the different DMTs

As can be seen in Figures 1A–1E, we found a correlation between the variation of the anti-HHV-6A/B IgG titers and the clinical response (absence of relapses and progression after two-years of follow-up) in MS patients treated with the different DMTs: 129/187 (69.0%) MS patients with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers were free of relapses and progression vs. 46/113 (40.7%) of MS patients with an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers ($p = 0.0000015$); statistical significant differences were found for each one of the DMTs, although the higher significance was found for natalizumab: 45/58 (77.6%) vs. 7/23 (30.4%) ($p = 0.00007$; O.R. = 7.9), respectively. The percentage of clinical responders was greater among those MS patients with

greater reductions of the anti-HHV-6A/B IgG titers, while the percentage of clinical responders in MS patients with an increase in their anti-HHV-6A/B IgG titers was lower when the percentage of increase was greater (Figures 1A–1E).

The mean variation of the anti-HHV-6A/B IgG titers (around 20% of increase or decrease) was lower than the mean variation of the anti-HHV-6A/B IgM titers (more than 30% of increase or decrease); no statistical significant correlations were found between the clinical response and the variation of the anti-HHV-6A/B IgM titers after two years with the different DMTs, only a trend for natalizumab when we compared MS patients with increases or decreases $>30\%$ (37.5% vs. 69.2%, respectively, $p = 0.089$). Finally, when we compare those MS patients with an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers $>20\%$ and with an increase of the anti-HHV-6A/B IgM titers $>30\%$ (both above the mean variation of increase) with those MS patients with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers $>20\%$ and with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgM titers $>30\%$ (both above the mean variation of decrease), for all the DMTs, we found a high statistical significance ($p = 0.00002$; O.R. = 39.9): 1/10 MS patients was free of relapses and progression vs. 31/38 MS patients, respectively.

An association was also found between the increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers and the clinical non-response (MS patients with at least two relapses and/or an increase of at least one point in the EDSS score after two years of follow-up with the different DMTs): 35/113 (31.0%) MS patients with an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers were non-responders vs. 33/187 (17.6%) MS patients with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers ($p = 0.0076$; O.R. = 2.1); furthermore, 22/54 (40.7%) MS patients with an increase $>20\%$ of the anti-HHV-6A/B IgG titers were non-responders vs. 11/77 (14.3%) MS patients with a decrease $>20\%$ ($p = 0.0006$; O.R. = 4.1). Again, the greater statistical significance was for natalizumab ($p = 0.018$; O.R. = 3.9).

Serology of HHV-6A/B in MS patients treated with IFN-beta without NABs

The 32.8% (43/131) of MS patients treated with IFN-beta were positive for NABs at least once along the two years of follow-up.

Anti-HHV-6 IgG and IgM in Multiple Sclerosis Patients

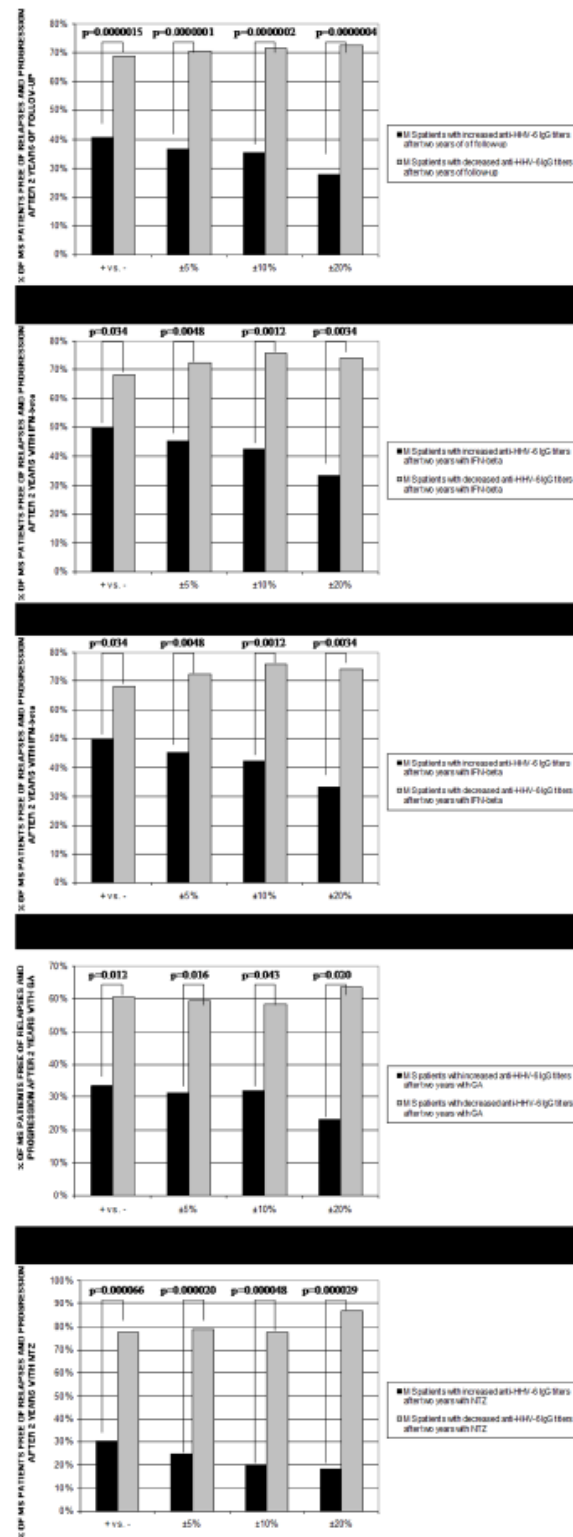


Figure 1. Percentage of MS patients free of relapses and progression after two years of follow-up from the 301 MS patients included in the longitudinal study. A. DMTs. B. interferon-beta (IFN-beta). C. IFN-beta (only in those MS patients that did not develop NABs). D. glatiramer acetate (GA). E. natalizumab (NTZ). Four comparisons have been performed for each treatment: MS patients with increased anti-HHV-6A/B IgG titers vs. MS patients with decreased anti-HHV-6A/B IgG titers; MS patients with an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers >5% vs. MS patients with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers >5%; MS patients with an increase or decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers >10%; MS patients with an increase or decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers >20%. doi:10.1371/journal.pone.0104836.g001

When we only considered those MS patients treated with IFN-beta that did not develop NABs in the 2-years of follow-up (Figure 1.C), we found that 16/38 (42.1%) MS patients with an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers were clinical responders vs. 39/50 (78%) MS patients with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers ($p = 0.0006$; O.R. = 4.9); furthermore, 4/21 (19%) MS patients with an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers >20% were clinical responders vs. 13/16 (81.2%) MS patients with a decrease of the anti-HHV-6A/B IgG titers >20% ($p = 0.0002$; O.R. = 18.4).

Serology of HHV-6A/B and EDSS

Only the 28.2% (53/188) of MS patients that did not experienced an increase in the EDSS score (the EDSS was equal or lower after 2-years of treatment) had an increase of the anti-

HHV-6A/B IgG titers; however, among those MS patients that experienced an increase in the EDSS after two years of treatment, the 62.9% (44/70) had an increase of the anti-HHV-6A/B IgG titers ($p = 0.0000003$; O.R. = 4.3). Furthermore, as we can see in Figure 2.A, the lower anti-HHV-6A/B IgG titers at 24-months visit, the greater the percentage of patients free of progression after two years of treatment.

Serology of HHV-6A/B and relapses

For the study of the anti-HHV-6A/B IgG and IgM response in relapses we included 216 serum samples collected in relapse and 278 serum samples collected within the three months before and after a relapse, from the total of 2163 serum samples collected from the 596 MS patients included in the study (Table 1). As can be seen in Figure 3.A, when we analyzed the anti-HHV-6A/B

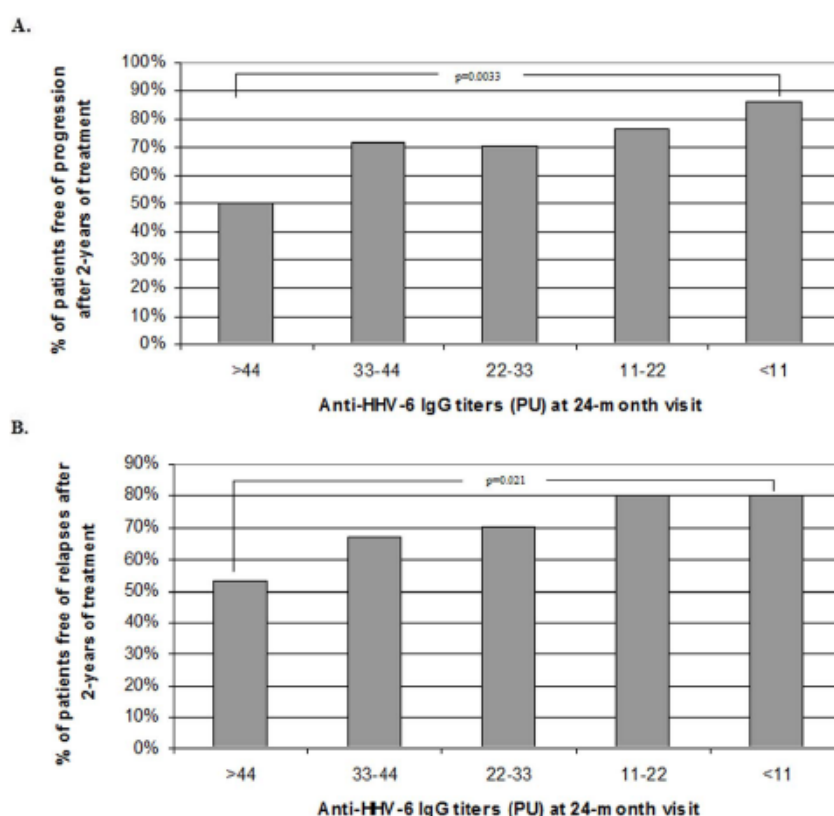


Figure 2. Association between the anti-HHV-6A/B IgG titers at the 2-years visit with the progression of the disease (A) and the activity of the disease (B) after two years of treatment with the different DMTs. A. 9/18 MS patients with titers >44 PU after 2-years of treatment were free of progression vs. 39/54 with titers between 33–44 PU vs. 74/104 with titers between 22–33 PU vs. 82/108 with titers between 11–22 PU vs. 15/17 with titers <11 PU. B. 10/18 MS patients with titers >44 PU after 2-years of treatment were free of relapses vs. 37/54 with titers between 33–44 PU vs. 74/104 with titers between 22–33 PU vs. 80/108 with titers between 11–22 PU vs. 14/17 with titers <11 PU. doi:10.1371/journal.pone.0104836.g002

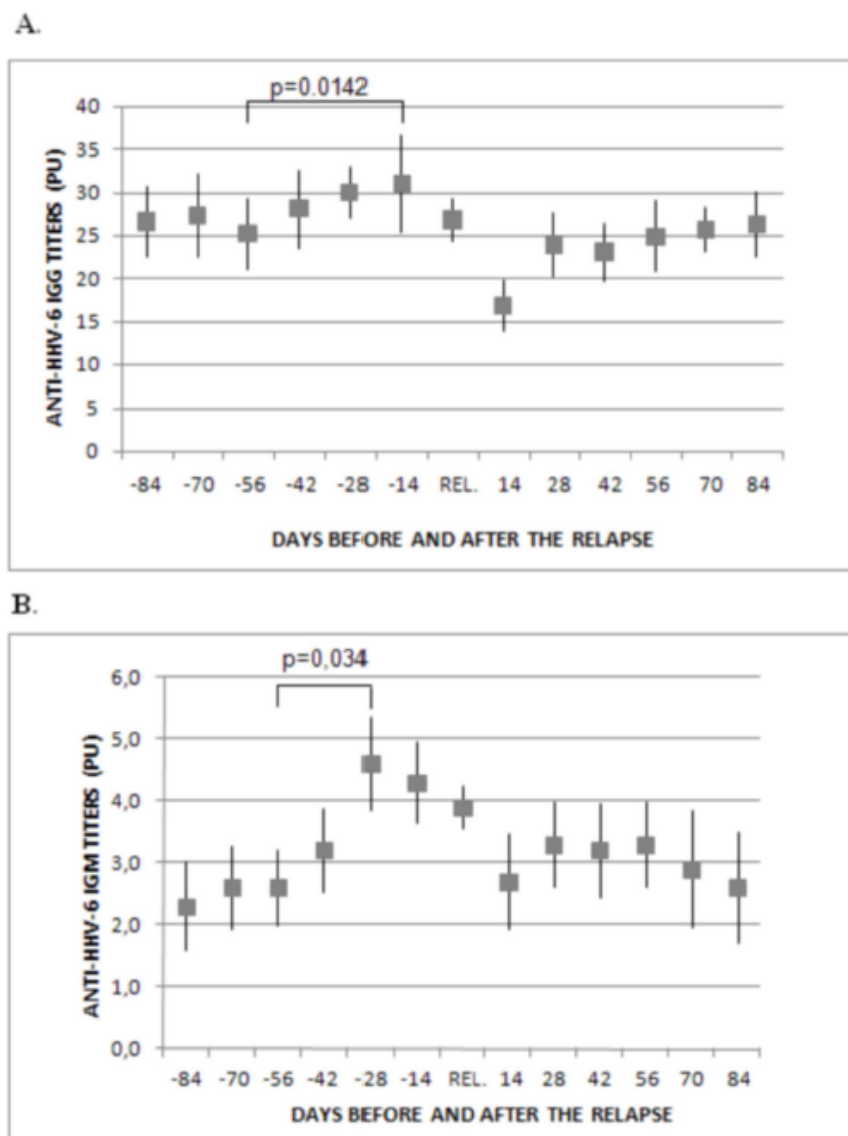


Figure 3. Anti-HHV-6A/B IgG and IgM titers in 216 serum samples collected in relapse (REL.) and in 278 serum samples collected three months before and after the relapse (n = 21 at day -84, n = 20 at day -70, n = 23 at day -56, n = 23 at day -42, n = 25 at day -28, n = 31 at day -14, n = 26 at day 14, n = 21 at day 28, n = 22 at day 42, n = 24 at day 56, n = 23 at day 70, n = 19 at day 84). A. Anti-HHV-6A/B IgG response. B. Anti-HHV-6A/B IgM response.
doi:10.1371/journal.pone.0104836.g003

IgG response in relapses, we found that two months before the relapse the IgG titers began to increase and they reached their highest value two weeks before the relapse ($p = 0.0142$); then, they began to decrease and reached the lowest value two weeks after the relapse. Similarly, the anti-HHV-6A/B IgM titers increased around two months before the relapse, they reached their highest value one month before the relapse ($p = 0.0344$), two weeks before the IgG response (Figure 3B). Furthermore, similarly to what happened to the progression, we found that higher titers of anti-HHV-6A/B IgG at 24-month visit was associated with a higher likelihood of relapses during the two years of treatment (Figure 2.B).

Discussion

The results of this study show a good correlation between the variation of the anti-HHV-6A/B IgG titers and the clinical response to the different DMTs in MS patients after two years of follow up (Figures 1A–1E). We found that MS patients with higher titers after two-years of treatment had higher likelihood of progression and relapses (Figure 2); and furthermore, we have found an association between the increase of the anti-HHV-6A/B IgG and IgM titers (Figure 3) with the upcoming relapses (however, as IgM antibodies to HHV-6 from Panbio can cross

react with a number of other viral antigens such as CMV and EBV, the serology of these viruses should be also analyzed).

In previous studies of our group, we have reported that the presence of HHV-6A/B DNA in blood and serum during IFN-beta treatment could be a good marker of poor response [18–20]. Similar results were found by other authors in MS patients treated with IFN-beta when serum cell-free DNA of HHV-6A/B was analyzed [21]. IFN-beta is a cytokine naturally expressed in response to viral infections [22], however, its mechanism of action in MS is not completely understood, but it has been speculated that, besides its immunomodulatory properties, the efficacy of IFN-beta may be related to its antiviral properties [23]. However, it has been observed consistently that a proportion of patients (2% to 47%) develop NABs directed against IFN beta as a consequence of the treatment [24,25]. In our study, the 32.8% of MS patients was positive for NABs; as NABs are associated with a loss of efficacy of IFN-beta treatment and a reduced bioavailability, they appeared at any time of the four scheduled visits and while some NABs positive patients remained positive along the IFN-beta treatment, others patients became negative, we decided to evaluate the variation of the anti-HHV-6A/B IgG titers only in an homogenous cohort of MS patients without NABs. As we have previously mentioned, the correlation between the anti-HHV-6A/B IgG variation and the clinical response was greatly enhanced when we only considered those MS patients treated with IFN-beta that did not develop NABs ($p = 0.0006$) instead of the whole population of IFN-beta treated MS patients ($p = 0.034$). Therefore, it would be important to distinguish between MS patients with and without NABs in future studies of other viruses and possible biomarkers in MS patients treated with IFN-beta, to obtain more accurate and reliable results.

There are not previous studies on GA and viruses in MS. GA is an acetate salt of a random polymer of four amino acids that shares some cross-reactivity with myelin basic protein (MBP) [26]. The mechanisms by which GA exerts its effects in MS patients are not fully elucidated: generating suppressor cells, inducing tolerance, expanding regulatory T-cell populations, and altering antigen-presenting cells have all gained favor for a time as the mechanism for the immunomodulatory effects of GA [27]. In our study, we found a significant correlation between the reduction of the anti-HHV-6A/B IgG titers after 2-years of treatment and the clinical response.

Natalizumab is a humanized monoclonal antibody that selectively binds to the $\alpha 4$ -integrin component of adhesion molecules found on lymphocytes, monocytes, and eosinophils; thus, natalizumab inhibits the interaction of $\alpha 4\beta 1$ with VCAM-1,

and because VCAM-1 is expressed on inflamed cerebrovascular endothelial cells, $\alpha 4\beta 1$ is believed to be the critical target of natalizumab in preventing leukocyte migration into the central nervous system in MS [28]. Furthermore, it has been published that the treatment leads to a significant decrease in serum IgM and IgG levels in patients with MS; these findings might support the hypothesis that natalizumab interferes with homing of B cells, possibly leading to impaired differentiation into plasma cells and subsequently disturbed immunoglobulin synthesis [29]. In our study, we have also found a significant decrease of the anti-HHV-6A/B IgG and IgM titers after two-years of treatment; but, what it is most interesting, we have found a high correlation between the variation of the anti-HHV-6A/B IgG titers and the clinical response to this treatment (Figure 1.E).

The relationship with the clinical response for all the DMTs was found both for the progression and for the relapses. Furthermore, the increase of the anti-HHV-6A/B IgG and IgM titers predicts the upcoming clinical relapses. Recently, Simpson et al. [30] published that HHV-6A/B infection or the immune response to HHV-6A/B antigens may have an effect on the risk of MS relapses, since the observed effect was directly related to anti-HHV-6A/B IgG titers and may indicate that either HHV-6A/B infection or factors associated with an altered humoral immune response to HHV-6A/B may have an effect on MS clinical course.

Then, we can conclude that the measurement of the anti-HHV-6A/B IgG titers could be a good biomarker of clinical response to the different DMTs. However, without magnetic resonance imaging (MRI) data, we really don't have a full picture about disease activity and therapeutic responses of the MS patients included in this study; further longitudinal studies that include MRI data are needed to validate these results.

Acknowledgments

We are indebted to María Concepción Ramírez and María Jesús Díez who collected the specimens.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RAL. Performed the experiments: IOM MGM MIDM AGM AMAL IC. Analyzed the data: RAL IOM MGM MIDM IC RA. Contributed reagents/materials/analysis tools: IOM MGM MIDM AGM AMAL IC RA. Contributed to the writing of the manuscript: IOM RAL RA.

References

- Nosworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 343: 938–952.
- Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, et al. (2009) Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISE study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 374: 1503–1511.
- Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, et al. (2009) Long-term effect of early treatment with interferon beta-1b after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: 5-year active treatment extension of the phase 3 BENEFIT trial. *Lancet Neurol* 8: 987–997.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, et al. (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354: 899–910.
- Tselis A (2011) Evidence for viral etiology of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 31: 307–316.
- Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, et al. (2001) Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 286: 3083–3088.
- Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, et al. (2005) Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 293: 2496–2500.
- Salveti M, Giovannoni G, Aloisi F (2009) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 22: 201–206.
- Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DI, Coulter SN, et al. (1995) Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7440–7444.
- Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM (2003) Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 187: 1365–1376.
- Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, et al. (1997) Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med* 3: 1394–1397.
- Hollberg P, Kusk M, Bech E, Hansen HJ, Jakobsen J, et al. (2005) Presence of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6B DNA in multiple sclerosis patients: associations with disease activity. *Acta Neurol Scand* 112: 395–402.
- Akarez-Lafuente R, Martínez A, García-Montojo M, Mas A, De Las Heras V, et al. (2010) MHC2TA rs4774C and HHV-6A active replication in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 17: 129–135.
- Akhyani N, Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Eaton JM, et al. (2000) Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: Increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis* 182:1321–1325.

15. Soldan SS, Leist TP, Juhng KN, McFarland HF, Jacobson S (2000). Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 47:306–313.
16. Garcia-Montoto M, Dominguez-Mozo MI, De las Heras V, Bartolome M, Garcia-Martinez A, et al. (2010) Neutralizing antibodies, MxA expression and MMP-9/TIMP-1 ratio as markers of bioavailability of interferon beta treatment in multiple sclerosis patients. A two years follow-up study. *Eur J Neurol* 17: 470–478.
17. Kawade Y (1986) Quantitation of neutralization of interferon by antibody. *Methods Enzymol* 119: 558–573.
18. Álvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Montoto-García M, Arroyo R (2006) Human Herpesvirus 6 and multiple sclerosis: a one-year follow-up study. *Brain Pathology* 16: 20–27.
19. Álvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolomé M, Picazo JJ, Arroyo R (2004) Beta interferon treatment reduce HHV-6 viral load in multiple sclerosis relapses but not in remission. *Eur Neurol* 52: 87–91.
20. Garcia-Montoto M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo M, Bartolome M, Garcia-Martinez MA, et al. (2011) Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon beta 1b in multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol* 18: 1027–1035.
21. Hong J, Tejada-Simon MV, Rivera VM, Zang YC, Zhang JZ (2002) Anti-viral properties of interferon beta treatment in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 8: 237–242.
22. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, et al. (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6: 975–990.
23. Johnson KP (1997) The historical development of interferons as multiple sclerosis therapies. *J Mol Med* 75: 89–94.
24. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P, Sölberg Sørensen P (2004) Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 251: II15–II24.
25. Hurwitz BJ (2008) Important sources of variability in clinical studies of neutralizing antibodies against interferon beta. *J Neurol Sci* 272: 8–19.
26. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, et al. (1995) Copolymer-1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double blind, placebo-controlled trial. The Copolymer-1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45: 1268–1276.
27. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ (2010) The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. *Neurology* 74: S25–S30.
28. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA (2005) Anti- α 4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology* 64: 1336–1342.
29. Selzer RC, Biberacher V, Grummel V, Buck D, Eienbroker C, et al. (2013) Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 19: 1454–1461.
30. Simpson SJ, Taylor B, Dwyer DE, Taylor J, Blizard L, et al. (2012) Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis. *Mult Scler* 18: 799–806.

